

**UNTERSUCHUNGEN ZUR WIRKUNG
MAMMATUMORHEMMENDER VERBINDUNGEN**

Gerhard Kranzfelder

1977



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555626_0036

DISSERTATIONS- UND FOTODRUCK FRANK oHG
8 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2 8 0 9 0 9 0

UNTERSUCHUNGEN ZUR WIRKUNG MAMMATUMORHEMMENDER VERBINDUNGEN

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

des Fachbereiches Chemie und Pharmazie

der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Gerhard Kranzfelder

aus

Augsburg

1977



1. Berichterstatter:

Prof. Dr. H. Schönenberger

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. F. Eiden

Tag der mündlichen Prüfung:

30. 6. 1977

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität München durchgeführt.

Die Anregung zu dieser Arbeit erhielt ich von Herrn Professor Dr. H. Schönenberger, dem ich für die wissenschaftliche Anleitung und Betreuung zu großem Dank verpflichtet bin.

Herrn Professor Dr. F. Eiden und Herrn Professor Dr. H.-D. Stachel, Vorstände des Instituts für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität München, danke ich für das mir entgegengebrachte persönliche Interesse und Wohlwollen.

Ebenso gilt mein Dank Herrn Professor Dr. med. M. Kiese, Vorstand des Pharmakologischen Instituts der Universität München, Herrn Professor Dr. med. G. Lange*, Leiter der Abteilung für Toxikologie der GSF, Neuherberg bei München sowie dessen Nachfolger, Herrn Professor Dr. med. H. Greim für die freundliche Aufnahme in den Instituten und die Förderung meiner pharmakologischen Untersuchungen.

Ferner danke ich der GSF für die Gewährung eines Stipendiums.

Mein Dank gilt auch den Herren Professor Dr. H. Wagner und Dr. habil. J. Hölzl, in deren Isotopenlabor ich die Szintillationsmessungen durchführen konnte.

Herrn Professor Dr. R. Maurer, Fachbereich Pharmazie der FU Berlin, danke ich für die freundliche Unterstützung bei der Erarbeitung des Rezeptortestes.

*Am 25. 9. 1973 verstorben.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1.	Einleitung 1
1.1.	Problemstellung 1
1.1.1.	Mammatumorphemmende Antiöstrogene 1
1.1.2.	Mammatumorphemmende, Östrogenrezeptor-affine Cytostatica 1
1.1.3.	Geprüfte Verbindungen (Formelübersicht) 2
1.1.4.	Testsystem 9
1.2.	Vorstellungen zum molekularen Wirkungsmechanismus der Östrogene 9
1.3.	Vorstellungen zum molekularen Wirkungsmechanismus der Antiöstrogene 13
1.4.	Vorstellungen zum Wirkungsmechanismus mammatumorphemmender Östrogenrezeptor-affiner Cytostatica 16
2.	Eigener Beitrag 19
2.1.	Testsystem zur Prüfung mammatumorphemmender Antiöstrogene und Östrogenrezeptor-affiner Cytostatica 19
2.2.	Versuchsergebnisse 26
2.2.1.	Entwicklung antiöstrogener Verbindungen aus Diäthylstilböstrol und Hexöstrol: stellungs-isomere Diäthylstilböstrole und Hexöstrole
2.2.1.1.	Bestimmung der Dissoziationskonstanten 26
2.2.1.2.	Bestimmung der uterotropen und kolpotropen Eigenschaften 36
2.2.1.3.	Bestimmung der antiöstrogenen Eigenschaften 51
2.2.1.4.	Bestimmung der Reversibilität der Rezeptorbindung 56
2.2.1.5.	Hemmung des DMBA-induzierten hormonabhängigen Mammatumors der SD-Ratte 59
2.2.1.6.	Hemmung der DNA-, RNA- und Proteinsynthese des Walker-256-Carcinosarkoms; sowie Bestimmung der cytociden Wirkung 66
2.2.2.	Entwicklung antiöstrogener Verbindungen aus Hexöstrol: N-isostere Hexöstrole vom Typ der N,N'-Dialkyl-1,2-diaryl-äthylendiamine 70
2.2.2.1.	Bestimmung der Rezeptoraffinität, der Dissoziationskonstanten K_d und der Reversibilität der Inhibitor-Rezeptor-Bindung 70

2.2.2.2.	Bestimmung der uterotropen, kolpotropen und antiuterotropen Eigenschaften	80
2.2.2.3.	Hemmung des DMBA-induzierten hormonabhängigen Mammacarcinoms der SD-Ratte durch meso-N,N'-Dipropyl-1,2-di-(2',6'-dichlorphenyl)-äthylendiamin	81
2.2.3.	Versuche zur Entwicklung Östrogenrezeptor-affiner Cytostatica: 3,4-Di-(3'-aminomethyl-4'-hydroxyphenyl)-hexane, 3- bzw. 3,3'-Di-(aminomethyl)-4,4'-dihydroxy- α,β -diäthylstilbene und 4,4'-Dicarbamoyl- α,β -diäthylstilbene	84
2.2.3.1.	Bestimmung der Dissoziationskonstanten K_i und der Reversibilität der Inhibitor-Rezeptor-Bindung der Hexöstrolsterivate	84
2.2.3.2.	Bestimmung der Dissoziationskonstanten K_i der Diäthylstilböstrolsterivate	89
2.2.3.3.	Bestimmung der uterotropen, kolpotropen und antiuterotropen Eigenschaften	96
2.2.3.4.	Hemmung der DNA-, RNA- und Proteinsynthese von Walker-256-Carcinosarkomzellen in vitro	102
2.2.4.	Untersuchung zur Entwicklung von Verbindungen mit antiinflammatorischen und mammatumorrhemmenden Eigenschaften: 4,5-Di-(4'-hydroxyphenyl)-imidazole	103
2.2.4.1.	Bestimmung der Dissoziationskonstanten K_i und der Reversibilität der Inhibitor-Rezeptor-Bindung	103
2.2.4.2.	Bestimmung der uterotropen, kolpotropen und antiuterotropen Eigenschaften	107
2.2.4.3.	Hemmung des DMBA-induzierten hormonabhängigen Mammacarcinoms der SD-Ratte durch 2-Phenyl-4,5-di-(4'-hydroxyphenyl)-imidazol	107
2.2.4.4.	Hemmung der DNA-, RNA- und Proteinsynthese von Walker-256-Carcinosarkomzellen in vitro	110
2.3.	Diskussion	111
2.3.1.	Entwicklung antiöstrogener Verbindungen aus Diäthylstilböstrol und Hexöstrol	111
2.3.1.1.	Stellungsisomere Diäthylstilböstrole und Hexöstrole	111
2.3.1.2.	N-isostere Hexöstrole: N,N'-Dialkyl-1,2-diaryl-äthylendiamine	121
2.3.2.	Entwicklung potentieller cytotoxischer Verbindungen mit Diäthylstilböstrol und Hexöstrol als Östrogenrezeptor-affine Carrier	128
2.3.3.	Entwicklung potentieller antiinflammatorischer, mammatumorrhemmender 4,5-Di-(4'-hydroxyphenyl)-imidazole	135

III

3.	Experimenteller Teil	139
3.1.	Methodik der Untersuchungen am Östrogenrezeptor in vitro	139
3.1.1.	Schema des Testverfahrens	139
3.1.2.	Herstellung des Cytosols	140
3.1.3.	Kohleadsorptionstechnik	141
3.1.4.	Versuchsaufbau zur Bestimmung der Rezeptor- affinität	142
3.1.5.	Berechnung der Dissoziationskonstanten K_d und K_i	143
3.1.6.	Auswertung der Versuchsergebnisse	145
3.1.7.	Bestimmung der Reversibilität der Inhibitor- Rezeptor-Bindung	146
3.1.8.	Überprüfung des in vitro-Rezeptor-Testsystems	146
3.1.9.	Einfluß von Äthanol auf die Östradiol-Rezeptor- Wechselbeziehung	151
3.1.10.	Versuche zur Wahl der geeignetsten Rezeptorquelle	151
3.2.	Uterotroper Test (modifiziert nach Rubin)	154
3.3.	Antiuterotroper Test	155
3.4.	Kolpotroper Test (Allen-Doisy-Verfahren)	156
3.5.	In vitro-Prüfung auf Hemmung der DNA-, RNA- und Proteinsynthese, sowie auf cytocide Wirkung am Walker-256-Carcinosarkom	157
3.6.	Testung am DMBA-induzierten hormonabhängigen Mammacarcinom der SD-Ratte	159
3.6.1.	Tumorinduktion	159
3.6.2.	Therapieschema und Datenerfassung	159
3.6.3.	Auswertung der Versuche	159
3.7.	Analytische Methoden	161
3.8.	Bereitung der Substanzen für die Tierversuche	165
4.	Zusammenfassung	166
5.	Literaturverzeichnis	169

1. Einleitung

1.1. Problemstellung

In unserem Arbeitskreis wurden in den vergangenen Jahren verschiedene Verbindungstypen mit potentiellen mammatumorhemmenden Eigenschaften synthetisiert (siehe Formelübersicht).

1.1.1. Mammatumorhemmende Antiöstrogene

Ausgangspunkt dieser Untersuchungen sind die Östrogene Diäthylstilböstrol und Hexöstrol. Beide Verbindungen führen wie natürliche Östrogene in physiologischen Dosen zu einer Wachstumsstimulierung hormonabhängiger Mammacarcinome. Wie andere 'target'-Gewebe enthalten hormonabhängige Mammatumoren Rezeptoren, die Östrogene mit hoher Spezifität binden. Als Folge dieser Hormon-Rezeptor-Wechselbeziehung kommt es zur Bildung mitogener Proteine, die Wachstumsvorgänge in 'target'-Geweben auslösen. Durch Entfernung östrogenproduzierender Organe (Ovarektomie, Adrenalektomie) wird das Wachstum des hormonabhängigen Mammacarcinoms gehemmt, wobei in zahlreichen Fällen ein Rückgang oder sogar ein Verschwinden der Geschwulst beobachtet wird.

Seit kurzem ist bekannt, daß mit Antiöstrogenen ähnliche therapeutische Effekte erzielbar sind (1). Antiöstrogene lassen sich durch systematische strukturelle Abwandlung von Östrogenen synthetisieren, wie das im Falle unserer eigenen Untersuchungen, ausgehend von Diäthylstilböstrol und Hexöstrol, geschehen ist (Verb.-Typ Ia, IIa, IIIa, b, c - VIa, b, c).

1.1.2. Mammatumorhemmende, Östrogenrezeptor-affine Cytostatica

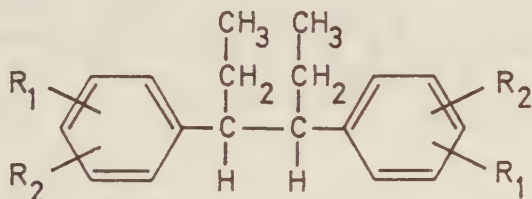
Ein anderes Forschungsprojekt, das in diesem Zusammenhang von großem Interesse ist, betrifft die Synthese cytotoxischer Verbindungen, die als Carriermolekül einen rezeptoraffinen Rest enthalten. Von solchen Substanzen ist anzunehmen, daß sie sich in Mam-

matumorzellen anreichern und diese daher stärker als hormonunabhängige Wirtszellen schädigen.

Sie rufen therapeutische Effekte beim Mammacarcinom wahrscheinlich in niedrigeren Dosierungen als bekannte Cytostatica hervor und dürften für den Patienten deshalb weniger toxisch sein. Bei den in dieser Arbeit geprüften potentiellen Cytostatica mit rezeptoraffinen Resten handelt es sich um Stilböstrole und Hexöstrole mit 3- bzw. 3,3'-ständigen Aminomethylgruppen (Verb.-Typ Ib, IIb, IIc), sowie um Diester aus Diäthylstilbüstrol und Carbaminsäure bzw. N-Bis-(β -chloräthyl)-carbaminsäure (Verb.-Typ. IIId). Aminomethylierte Phenole reagieren nach Untersuchungen von Andrisano und Mitarb. (52) unter Eliminierung der Aminogruppe mit nukleophilen Substraten. Finden solche Reaktionen unter physiologischen Bedingungen statt, so führen sie zu einer Hemmung des Zellstoffwechsels (76).

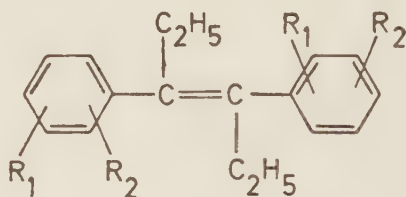
1.1.3. Geprüfte Verbindungen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden folgende Verbindungen auf mögliche mammatumorhemmende Eigenschaften geprüft:

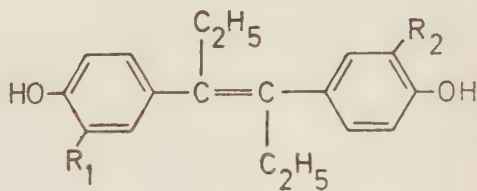


3,4-Di-(2¹,3'- bzw. 4'-hydroxyphenyl)-hexan (Verb.-Typ Ia),
 3,4-Di-(3'-aminomethyl-4'-hydroxyphenyl)-hexane (Verb.-Typ Ib):

Verb. Typ	Verb.-Nr.	R ₁	R ₂
Ia	1	2-OH	H
	2	3-OH	H
	3	4-OH	H
Ib	4	4-OH	3-CH ₂ -N(CH ₃) ₂
	5	4-OH	3-CH ₂ -N(C ₂ H ₅) ₂
	6	4-OH	3-CH ₂ -N 
	7	4-OH	3-CH ₂ -N 



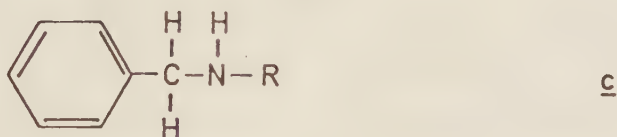
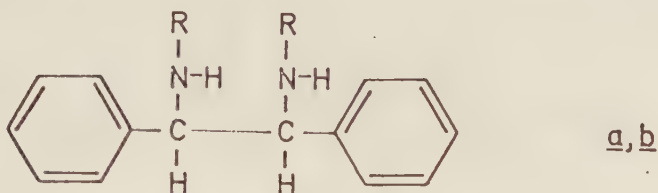
IIa,d



II b,c

2,2'-, 3,3'- bzw. 4,4'-Dihydroxy- α,β -diäthylstilbene (Verb.-Typ.IIa),
 3-(Aminomethyl)-4,4'-dihydroxy- α,β -diäthylstilbene (Verb.-Typ.IIb),
 3,3'-Di-(aminomethyl)-4,4'-dihydroxy- α,β -diäthylstilbene (Verb.-
 Typ.IIc),
 4,4'-Dicarbamoyl- α,β -diäthylstilbene (Verb.-Typ.IId):

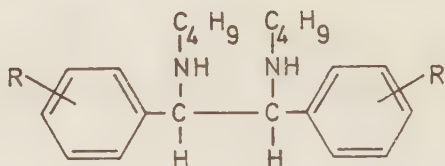
Verb. Typ	Verb.-Nr.	R ₁	R ₂
IIa	8	2-OH	H
	9	3-OH	H
	10	4-OH	H
IIb	11	H	3-CH ₂ -N(CH ₃) ₂
	12	H	3-CH(C ₆ H ₅)-N(CH ₃) ₂
IIc	13	R ₁ =R ₂	3-CH ₂ -NH ₂
	14	R ₁ =R ₂	3-CH ₂ -N(CH ₃) ₂
	15	R ₁ =R ₂	3-CH ₂ -N 
	16	R ₁ =R ₂	3-CH ₂ -N 
	17	R ₁ =R ₂	3-CH ₂ -N ⁺ (CH ₃) ₃ J ⁻
IId	18	H	4-O-CO-NH ₂
	19	H	4-O-CO-NH-CH ₃
	20	H	4-O-CO-N(CH ₂ -CH ₂ -Cl) ₂



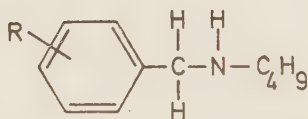
racem- und meso-N,N'-Dialkyl-1,2-diphenyl-äthylendiamine (Verb.-Typ IIIa und b),

N-Alkyl-benzylamine (Verb.-Typ IIIc):

Verb.-Nr.	R	Verb.-Nr.	R
21	-CH ₃	29	-CH ₂ (CH ₂) ₃ -CH ₃
22	-CH ₂ -CH ₃	30	-CH ₂ CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃
23	-CH ₂ -CH ₂ -CH ₃	31	-CH ₂ CH ₂ CH(CH ₃) ₂
24	-CH(CH ₃) ₂	32	-CH ₂ (CH ₂) ₄ -CH ₃
25	-CH ₂ (CH ₂) ₂ -CH ₃	33	-CH(CH ₃)CH ₂ CH(CH ₃) ₂
26	-CH ₂ -CH(CH ₃)-CH ₃	34	-CH(CH ₃)C(CH ₃) ₃
27	-CH(CH ₃)-CH ₂ -CH ₃	35	-CH(CH ₃)CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃
28	-C(CH ₃) ₃	36	-(CH ₂) ₃ CH(CH ₃) ₂



a, b

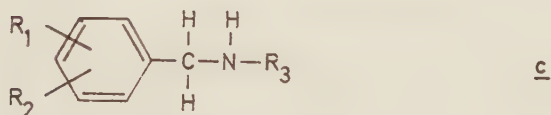
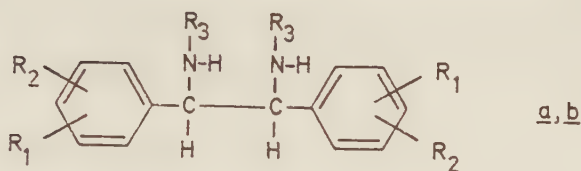


c

racem- und meso-N,N'-Dibutyl-1,2-diphenyl-äthylendiamine (Verb.-Typ IV a und b),

N-Butyl-benzylamine (Verb.-Typ IVc):

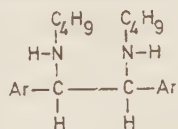
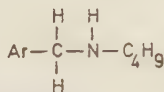
Verb.-Nr.	R	Verb.-Nr.	R	Verb.-Nr.	R
37	2-CH ₃	44	3-Cl	51	4-OC ₂ H ₅
38	3-CH ₃	45	4-Cl	52	4-OC ₃ H ₇
39	4-CH ₃	46	3-Br	53	4-OC ₄ H ₉
40	2-F	47	4-Br	54	3-OCH ₂ Ph
41	3-F	48	3-J	55	4-OCH ₂ Ph
42	4-F	49	4-C ₆ H ₅	56	4-N(CH ₃) ₂
43	2-Cl	50	4-CN	57	4-N(C ₂ H ₅) ₂



racem- und meso-N,N'-Dialkyl-1,2-diphenyl-äthylendiamine (Verb.-Typ Va und b),

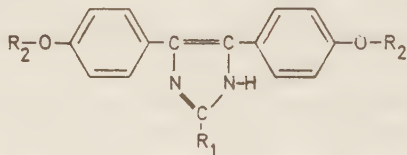
N-Alkyl-benzylamine (Verb.-Typ Vc):

Verb.-Nr.	R ₁	R ₂	R ₃	Verb.-Nr.	R ₁	R ₂	R ₃
58	2-Cl	4-Cl	CH ₃	63	2-Cl	6-Cl	C ₂ H ₅
59	2-Cl	4-Cl	C ₂ H ₅	64	2-Cl	6-Cl	C ₃ H ₇
60	2-Cl	4-Cl	C ₃ H ₇	65	2-Cl	6-Cl	C ₄ H ₉
61	2-Cl	4-Cl	C ₄ H ₉	66	3-Cl	4-Cl	C ₄ H ₉
62	2-Cl	6-Cl	CH ₃				

a, bc

racem- und meso-N,N'-Dibutyl-1,2-diaryl-äthylendianine (Verb.-Typ VIa und b),
N-Butyl-arylmethyl-amine (Verb.-Typ VIc):

Verb.-Nr.	Ar
67	1-Naphthyl
68	2-Naphthyl
69	9-Phenanthryl



4,5-Di-(4'-hydroxyphenyl)-imidazole (Verb.-Typ VII):

Verb.-Nr.	R ₁	R ₂
70	-C ₆ H ₅	CH ₃
71	-C ₆ H ₅	H
72	-CH ₃	H
73	H	H

Die Synthese der in der Formelübersicht aufgeführten Verbindungen erfolgte durch Schmitt-Wallenborn H. Verbindungen 1,2 (2) , Schmidt F. 4-7, 14-16 (3) , Adam D. 8,9 (4) , Mautz J. 11-13, 17-20 (5) , Hoffmann E. 21-48 (6) , Taneja A.K. 49-69 (7) , Bernhauer H. 70-73 (8) .

1.1.4. Testsystem

Es wurde ein Testverfahren entwickelt, das die pharmakologische Bewertung von Antiöstrogenen und rezeptoraffinen Cytostatica mit mammatumورهemmenden Eigenschaften gestattet. Dieses Testsystem umfaßt in vitro- und in vivo-Versuche zur Auffindung östrogenener, antiöstrogenener und mammatumورهemmender Eigenschaften sowie eine erweiterte Prüfung auf cytostatische Wirkung an hormonunabhängigen Tumoren.

1.2. Vorstellungen zum molekularen Wirkungsmechanismus der Östrogene

Die ersten Hinweise auf eine endokrine Regulation des Wachstums menschlicher Mammatumoren gab Beatson (9) 1896, als er nach Ovariectomie einen Rückgang der Tumoren beobachtete. Jensen und Jakobsen (10) berichteten 1962 zum erstenmal über eine Anreicherung von ^3H -Östradiol in Gebärmutter und Vagina. 1965 vermuteten Noteboom und Gorski (11) ein Protein als Bindungskomponente und stellten eine Stereospezifität der Bindung fest. Toft und Gorski (12, 13) untersuchten das cytoplasmatische Protein näher und simulierten die in vivo-Verhältnisse in einem zellfreien in vitro-System (14).

Östrogenbindende Proteine lassen sich aus den Uteri von Kaninchen, Ziege, Ratte, Maus, Schwein, Kalb und Mensch isolieren. Bei Mensch und Ratte konnten in Hypophyse und Hypothalamus (15), in Brustdrüse (16, 17) und hormonabhängigen Mammatumoren (18) ebenfalls Östrogenrezeptoren nachgewiesen werden.

70 - 80 % der DMBA-induzierten Mammacarcinome der SD-Ratte, 50 - 60 % der Primärtumoren und 35 - 40 % der metastasierenden Mammatumoren des Menschen enthalten durchschnittlich 90 fMol Rezeptoren pro mg Gewebe. Mammatumoren ohne Östrogenrezeptoren sind hormonunabhängig; sie sprechen auf endokrine Therapie (Ovarektomie, Östrogene, Antiöstrogene) nicht an (19). Östrogenrezeptoren aus Uterus und Mammatumor von Ratte und Mensch weisen die gleiche Affinität zu 17β -Östradiol oder anderen Östrogenen auf (19). Ihr elektrophoretisches Verhalten und ihre Sedimentationskonstanten entsprechen sich.

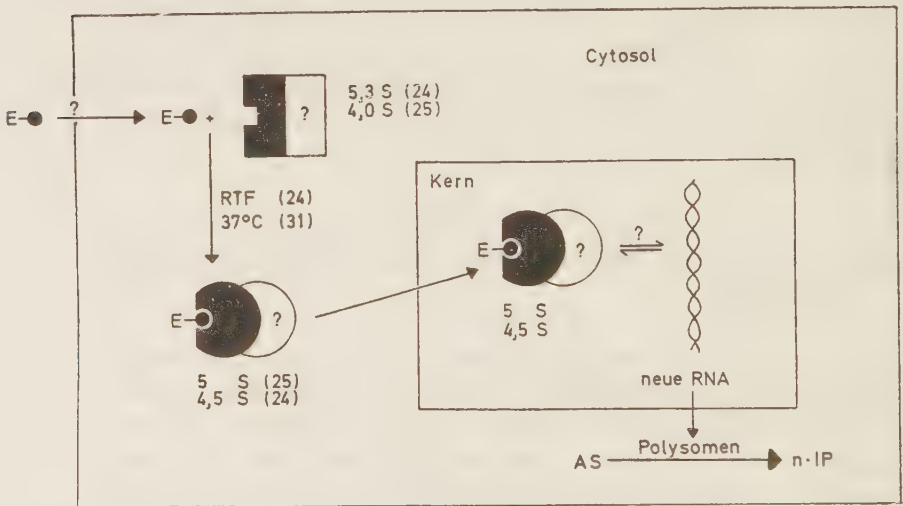


Abb. 1: Vorstellung zum molekularen Wirkungsmechanismus des Östradiols (69)

Östradiol wird im Blut durch Bindung an spezifische Plasmaproteine transportiert (20, 21). Die Bindung an diese Proteine scheint keine Voraussetzung für eine östrogene Wirkung zu sein, da das hochwirksame synthetische Östrogen Diäthylstilböstrol keine Affinität zu diesen besitzt. Der Eintritt östrogenen Substanzen in die 'target'-Zelle erfolgt durch Diffusion, wobei nach Milgrom (22) Proteine als Carrier fungieren.

Im Cytoplasma der 'target'-Zelle werden die Östrogene von spezifischen Rezeptoren gebunden. Dieser Vorgang führt zu einer Anreicherung des Hormons. Pro Zelle werden - je nach physiologischen Bedingungen (z.B. Cyclusstadien) - 10^4 bis 10^5 Rezeptoren nachgewiesen (23). In der Literatur findet man für den cytoplasmatischen Östradiol-Rezeptor-Komplex unterschiedliche Sedimentationskonstanten: 5,3 S (MG: 120000) bzw. 8,6 S (MG: 238000) und 4 S (MG: 75000) (24, 25).

Die divergierenden Angaben sind Ausdruck der großen Neigung des Rezeptors, mit anderen cytoplasmatischen Proteinen zu assoziieren; sie sind auf die unterschiedlichen Isolierungsmethoden (Ionenstärke) der Autoren zurückzuführen. Der Rezeptor bindet Östrogene hochspezifisch. Testosteron, Cortison und Progesteron haben keine, 17α -Östradiol hat nur eine geringe Affinität.

Die Struktur des Östrogenrezeptors und die Zusammensetzung des aktiven Zentrums sind unbekannt. SH-Blocker (z.B. Jodacetamid) hemmen die Östrogen-Rezeptor-Wechselbeziehung. Puca (26) vermutet einen Tyrosyl- oder Histidylrest im aktiven Zentrum oder in der Nähe desselben.

Östrogenmoleküle, Östrogenrezeptoren oder cytoplasmatische Östrogen-Rezeptor-Komplexe sind nicht zu einer Permeation der Kernmembran befähigt. Erst nach einem Transformationsprozeß gelangt der Östrogen-Rezeptor-Komplex in den Zellkern. Über die Transformation des Östradiol-Rezeptor-Komplexes existieren divergierende Vorstellungen. Nach Bresciani und Mitarb. (24) erfolgt die Umwandlung durch ein Ca^{2+} abhängiges proteolytisches Enzym (MG: 115 000; 6,4 S), das den 5,3 S Östradiol-Rezeptor-Komplex in einen 4,5 S Östradiol-Rezeptor-Komplex (MG: 61 000) umwandelt. Dieses Enzym wird als "receptor-transforming factor" (RTF) bezeichnet. Untersuchungen von Notides (27) unterstützen obigen Mechanismus. Notides konnte aus dem Uterus von Mensch und Ratte eine Proteinase isolieren, die einen 8 S Östradiol-Rezeptor-Komplex in einen 4,5 S Komplex umwandelt.

Gesichert ist, daß Östrogene nur nach einer Komplexierung mit dem Rezeptorprotein und nach dessen Umwandlung einen biologischen Effekt an der 'target'-Zelle auslösen. Dieser äußert sich bei juvenilen Ratten in einer zeitlich versetzten Erhöhung der RNA- und Proteinsynthese (32).

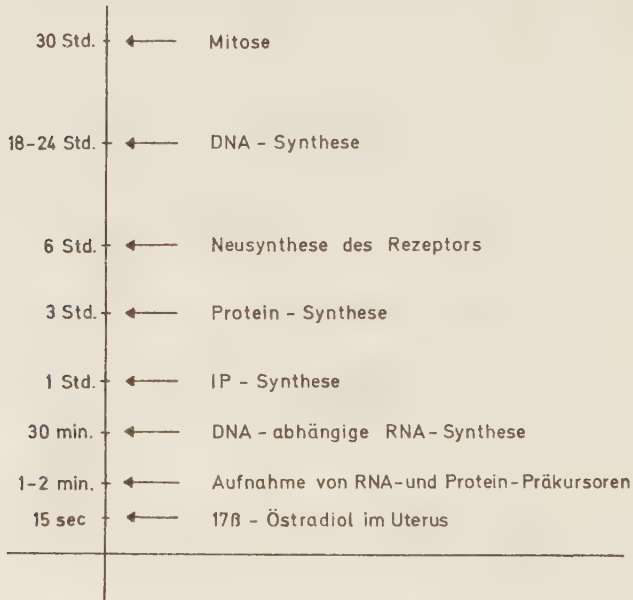


Abb. 2: Zeitlicher Ablauf der molekularen Ereignisse in der Uteruszelle nach ^3H -Östradiolgabe.

Der Vorgang, der zur Aktivierung des Mitosegens führt, ist noch nicht geklärt. Bresciani (24) und De Sombre (28) nehmen als Akzeptor des Östradiol-Rezeptor-Komplexes basische Proteine des Chromatins an. Sie übertreffen mengenmäßig den Östradiol-Rezeptor-Komplex um etwa das 10-fache.

Der starke Anstieg der r-RNA- und t-RNA-Synthese und der 'template' Aktivität des Chromatins, gefolgt von einer deutlich gesteigerten Proteinsynthese 0,5 bzw. 3 Stunden nach Östradiolgabe lassen auf eine Aktivierung großer Genmengen schließen (29). Die Auffindung

eines bereits nach 1 Stunde in kleinen Mengen (10 Moleküle pro Zelle) auftretenden Proteins (Östradiol-induziertes Protein: IP) deutet jedoch auf die Aktivierung nur weniger spezieller Gene hin (30).

1.3. Vorstellung zum molekularen Wirkungsmechanismus der Antiöstrogene

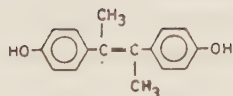
Die in Abb. 3 aufgeführten Antiöstrogene Nafoxidin, Tamoxifen, Dimethylstilböstrol (DMS) und Östriol hemmen die Aufnahme von ^3H -Östradiol in 'target'-Gewebe in vivo und in vitro (37, 38, 44). Sie verhindern somit, wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß, die stimulierenden Effekte endogener Östrogene auf Vagina, Uterus und Mammatumour.

Als Wirkungsmechanismen für die antagonistische Wirkung dieser Substanzklasse kommen mehrere Möglichkeiten in Betracht:

- I. Hemmung des spezifischen Transports von Östradiol durch die 'target'-Zellmembran.
- II. Hemmung der Östradiol-Rezeptor-Wechselbeziehung.
- III. Hemmung der Östradiol-bedingten Nukleinsäure- und Proteinbiosynthese.
- IV. Prolaktinantagonismus.
- V. Hemmung der Östradiolbiosynthese.

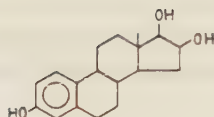
Zu I: Ein solcher Antagonismus könnte für Östriol in Erwägung gezogen werden, da es zu den membranständigen Carrierproteinen ebenso wie Östradiol eine hohe Affinität besitzt (22). Über Antiöstrogene vom Stilbentyp liegen keine derartigen Untersuchungen vor. Da das potente Östrogen 4,4'-DES nur eine geringe Membranrezeptor-Affinität besitzt, ist auch für die davon abgeleiteten Antiöstrogene ein Angriff am Östradiol-Transport-System unwahrscheinlich.

Zu II: Antiöstrogene hemmen die Bindung des Östradiols an den cytoplasmatischen Rezeptor. Ein kompetitiver Antagonismus wird



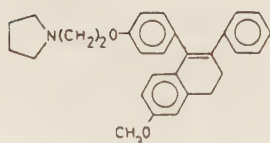
DMS

ID₅₀: 0,07 µg/ml
impeded Östrogen



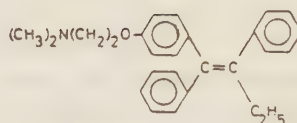
ÖSTRIOL

ID₅₀: 0,05 µg/ml
impeded Östrogen



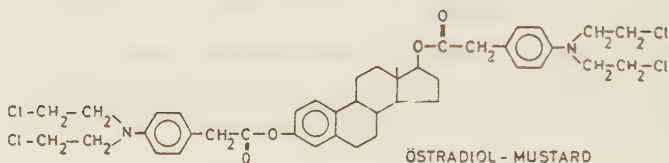
NAFOXIDIN

ID₅₀: 1 µg/ml
partielles Östrogen

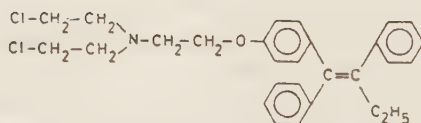


TAMOXIFEN

ID₅₀: 2 µg/ml
echtes Östrogen



ÖSTRADIOL - MUSTARD



TAMOXIFEN N - LOST

Abb. 3: Antiöstrogene und Cytostatica mit Östrogenrezeptor-affinen Carrierresten. Die Angaben zum Wirktyp und zur Hemmung der Östradiol-Rezeptor-Wechselbeziehung (ID₅₀) der Antiöstrogene wurden der Veröffentlichung von Terenius (37) entnommen.

für DMS (55), Östriol (55) und Nafoxidin (39) beschrieben, während bei Tamoxifen eine allosterische Hemmung der Rezeptor-Wechselbeziehung des Östradiols beobachtet wird (33). Die Versuche wurden in vitro an Cytosolen aus Kalbsuterus (Nafoxidin), Rattenuterus (DMS, Östriol), menschlichem Uterus und Mammatumor (Tamoxifen) durchgeführt. Für Nafoxidin, DMS und Östriol wurde ebenfalls eine Affinität zu den cytoplasmatischen Rezeptoren des DMBA-induzierten Mammatumors der Ratte und des menschlichen Mammatumors festgestellt (56, 34). DMS und Östriol bilden trotz hoher in vitro-Affinität mit den cytoplasmatischen Rezeptoren Komplexe von geringer 'intrinsic'-Aktivität (37, 60); sie sind jedoch in der Lage, die Anlagerung des endogenen Östradiols an den Rezeptor einzuschränken. Rochefort und Mitarb. (39) zeigten in Vorversuchen an Kalbsuteruscytosol die zu Östradiol relativ große Festigkeit der Nafoxidin-Rezeptor-Bindung. Die gleiche Arbeitsgruppe (62) beobachtete in vitro am Rattenuterus eine - im Vergleich zu Östradiol - verlangsamte und nicht quantitative Wanderung des Nafoxidin-Rezeptor-Komplexes in den Kern. Die Ursache dafür könnte eine behinderte Transformation des Nafoxidin-Rezeptor-Komplexes sein. Diese Beobachtungen können zur Erklärung der 'partiellen' östrogenen und antiöstrogenen Eigenschaften des Nafoxidins herangezogen werden. Derartige Untersuchungen wurden mit Tamoxifen nicht durchgeführt. Den Angriffspunkt dieses Antiöstrogens vermuten Lippman und Mitarb. (35) in einer Hemmung der Östradiol-Rezeptor-Wechselbeziehung im Cytoplasma. Sie zeigten an hormonabhängigen Mammatumorzellen des Menschen (MCF 7) die Aufhebung der Tamoxifenbedingten DNA-Synthese-Hemmung durch höhere Dosen Östradiol.

Zu III: Katzenellenbogen (42) untersuchte in vitro am isolierten Rattenuterus die Fragestellung, ob die Verbindungen DMS und Nafoxidin die Synthese des E_2 -induced protein (IP) hemmen (antiöstrogene Effekte) oder ob sie selbst die IP-Bildung induzieren (östrogene Effekte).

DMS zeigte eine starke, Nafoxidin eine schwache Synthesestimulierung.

Östradiol wurde in dieser Versuchsanordnung durch beide Verbindungen nicht antagonisiert. Dieser Befund ist erstaunlich, da

aufgrund seiner antiuterotropen Wirkung bei Nafoxidin ein E_2 -antagonistischer Effekt zu erwarten war.

Über die Funktion des E_2 -IP im Stoffwechsel von 'target'-Geweben bestehen z.Z. noch keine klaren Vorstellungen, so daß eine Bewertung der Versuchsergebnisse von Katzenellenbogen schwierig ist.

Clark und Mitarb. (40) vermuten als Grund für die antiöstrogenen Eigenschaften des Nafoxidins die mangelnde Fähigkeit des Nafoxidin-Kernrezeptor-Komplexes eine Rezeptorneosynthese zu stimulieren. Derartige Versuche wurden mit Tamoxifen nicht durchgeführt.

Zu IV: Zur Prolaktin-antagonisierenden Wirkung von Nafoxidin liegen widersprüchliche Befunde vor. Während Heuson (41) an ovariectomierten Ratten eine Hemmung der durch Östradiol initiierten Prolaktinausschüttung beobachtet, zeigen Leung und Mitarb. (47) ein Versagen von Nafoxidin am Prolaktin-stimulierten DMBA-Tumor. Unter Tamoxifen-Therapie werden an DMBA-Tumor tragenden Ratten keine zur Kontrolle verringerten Plasma-Prolaktinspiegel gemessen (45).

Zu V: Versuche zur Hemmung der Östradiolbiosynthese wurden nur mit dem Antiöstrogen Tamoxifen durchgeführt. Es wurde keine Wirkung beobachtet (45).

1.4. Vorstellungen zum Wirkungsmechanismus mammatumورهemmender Östrogenrezeptor-affiner Cytostatica

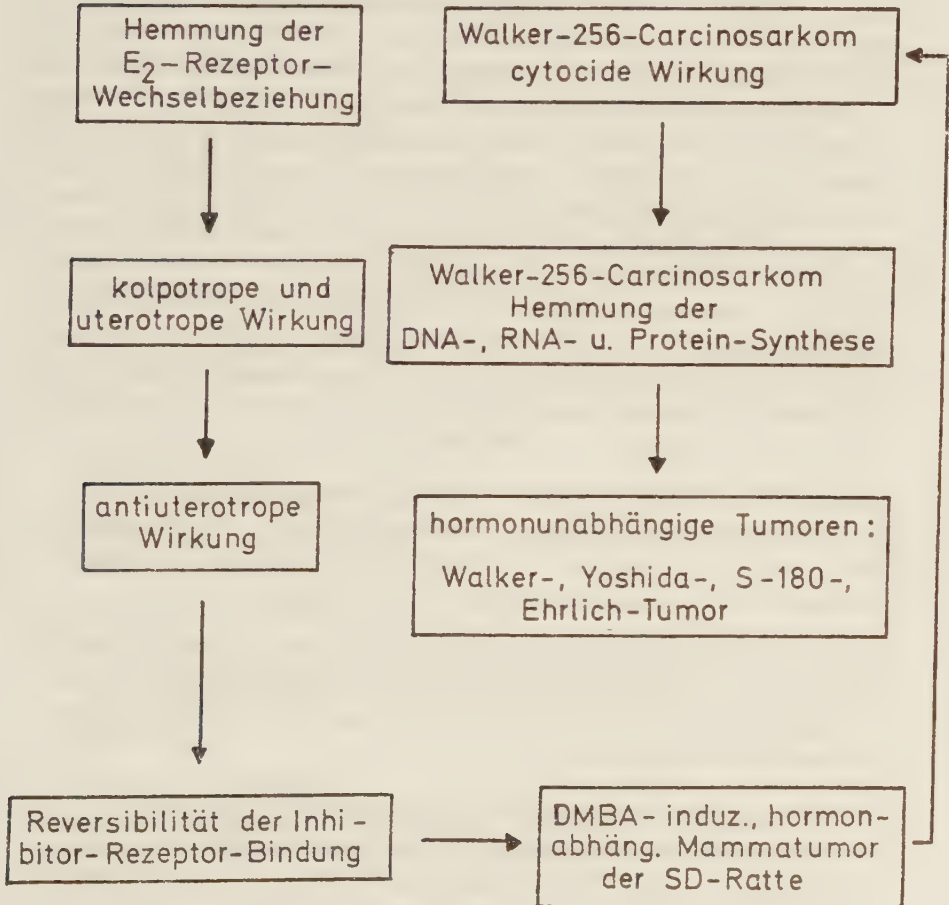
Der hormonabhängige DMBA-induzierte Mammatumor der Ratte ist wie das menschliche Mammacarcinom mit alkylierenden Cytostatica schlecht beeinflussbar (48). Der Grund hierfür ist, daß sich ca. 90 % der Tumorzellen in der G_0 -Phase befinden (49). Nicht proliferierende Tumorzellen (G_0 -Zellen) zeigen eine geringe Empfindlichkeit gegenüber alkylierenden Cytostatica (48), während proliferierende Tumorzellen (besonders in der S-Phase) besser ansprechen.

1. durch selektive Schädigung der proliferierenden Tumorzellen aufgrund der Fähigkeit zur Anreicherung und Alkylierung nukleophiler Substrate (z.B. DNA),
2. durch Inhibieren der E_2 -bedingten Transformation ruhender Tumorzellen (G_0 -Zellen) in proliferierende Tumorzellen.

Die Verwirklichung dieses Wirkprinzips ist nach den vorliegenden Versuchsergebnissen bis heute noch nicht gelungen. So zeigen die in Abb. 3 dargestellten Verbindungen aus alkylierenden Cytostatica und Östrogenen (Östradiol) bzw. antiöstrogenen (Tamoxifen) Carriermolekülen keine Affinität zu cytoplasmatischen Östrogenrezeptoren. Die Versuche wurden an Cytosolen mit Mammatumoren von Ratte und Mensch durchgeführt (53, 54). Shepherd und Mitarb. (54) fanden bei in vivo-Versuchen an Rattenuterus nach ip. Applikation von Östradiol-Mustard eine Wanderung von cytoplasmatischen Rezeptoren in den Kern. Sie tritt jedoch im Vergleich zu Östradiol erst wesentlich später auf, was die Autoren auf eine Hydrolyse des Moleküls in Östradiol und N-Bis-(β -chloräthyl)-aminophenylelessigsäure schließen läßt. In vivo-Versuche mit (1- {4- β - [bis(2-chloräthyl)-amino] ethoxyphenyl} diphenyl-but-1-en, dem N-Lost-Derivat des Tamoxifens am DMBA-induzierten Mammatumor der SD-Ratte ergaben keinen Östradiol-Antagonismus (45). Im Gegensatz zum Tamoxifen besitzt diese Substanz keine antiuterotropen Eigenschaften (45). Von den behandelten 8 DMBA-Tumoren sprachen nur 2 auf die N-Lost-Tamoxifen-Therapie an (45). Versuche mit Östradiol-Mustard am DMBA-Tumor der SD-Ratte wurden bisher nicht durchgeführt.

2. Eigener Beitrag

2.1. Testsystem zur Prüfung mammatumورهemmender Antiöstrogene und Östrogenrezeptor-affiner Cytostatica



Das Testsystem umfaßt Methoden zur Auffindung von Substanzen mit Östrogenrezeptor-affinen, Östrogenen, antiöstrogenen und anti-tumoralen Eigenschaften.

Im ersten Test werden die potentiellen mammatumorhemmenden Verbindungen auf ihre Fähigkeit zur Hemmung der Östradiol-Rezeptor-Wechselbeziehung geprüft. Als Rezeptorpräparation verwenden wir Cyto-sole aus Kalbsuterus und als Testmethode das DCC-Verfahren (DCC = Dextran Coated Charcoal). Die mit Kalbsuteruscytosol erzielten Hemmkonstanten (K_i) sind mit denen, die unter Verwendung von Cy- tosolen hormonabhängiger Mammatumoren erhalten werden, identisch. Die aus beiden Geweben isolierten Rezeptoren besitzen gleiche Af- finität zu 17β -Östradiol und zu anderen Östrogenen (19, 51). Die Ergebnisse bei der Hemmung der ^3H -Östradiol-Rezeptor-Wechselbe- ziehung durch die Prüfsubstanz werden mit denen des Kontrollver- suchs mit ^3H -Östradiol verglichen. Zu diesem Zweck werden Prüf- substanz und ^3H -Östradiol in Konzentrationen von 2×10^{-5} M bzw. 2×10^{-10} M eingesetzt. Wird unter diesen Bedingungen die Bindung von ^3H -Östradiol an den Rezeptor um mindestens 30 % reduziert, so erfolgt eine genaue Bestimmung der Dissoziationskonstanten K_i des Hemmstoff-Rezeptorkomplexes, wobei die Auswertung der Versu- che nach Lineweaver-Burk vorgenommen wird.

Ein positives Ergebnis besagt, daß die Prüfsubstanz zu einer Wechselbeziehung mit Östrogenrezeptoren befähigt ist; es erlaubt jedoch nicht die Aussage, ob es sich dabei um einen Agonisten (Östrogen) oder einen Antagonisten (Antiöstrogen) handelt.

Das Ergebnis zeigt ferner, daß die Verbindung zu einer Anreiche- rung in der Mammatumorzelle befähigt ist (eine Aussage, die im Zusammenhang mit der Entwicklung cytocider rezeptoraffiner Ver- bindungen von Wichtigkeit ist).

In der Regel führt der Einbau cytotoxischer Gruppierungen in Carriermoleküle zu einem Verlust der Rezeptoraffinität. Durch dieses Verfahren werden latente rezeptoraffine Verbindungen, die erst in vivo durch Biotransformation aus "prodrugs" gebildet wer- den, nicht erfaßt. Für eine weitere Prüfung im Rahmen dieses Testsystems kommen Verbindungen in Betracht, deren K_i -Werte

$< 10^{-5}$ M sind. Antiöstrogene mit großen K_1 -Werten erfordern bei der Therapie des Mammacarcinoms einen so hohen Dosierungsbereich, daß mit toxischen Nebeneffekten gerechnet werden muß.

Nachdem festgestellt wurde, daß die synthetische Abwandlung eines Östrogens (4,4'-HES bzw. 4,4'-DES) zu keiner Veränderung oder nur zu einer akzeptablen Verminderung der Rezeptoraffinität führt, wird geprüft, ob der gewünschte Verlust oder eine merkliche Abnahme der Östrogenen Wirkung eingetreten ist.

Die Feststellung möglicher östrogenen Effekte erfolgt im vorgestellten Testsystem mit zwei Methoden:

- a. durch die Bestimmung der kolpotropen Wirkung bei ovariectomierten Mäusen (Allen-Doisy-Test);
- b. durch gravimetrische Bestimmung des Uterustrockengewichts juveniler Mäuse, ein Verfahren, das auch die Feststellung des Wirktyps des Östrogens gestattet.

Im Prinzip kann die synthetische Abwandlung eines Östrogens neben der Bildung von nicht rezeptoraffinen Verbindungen zu 4 Wirkungstypen führen:

1.) echte Östrogene

Substanzen mit steiler Dosis-Wirkungskurve (kleine Dosissteigerung führt zu großer Wirkungssteigerung); Beispiele: Östradiol, Östron, 4,4'-HES, 4,4'-DES.

2.) "partielle" Östrogene

Substanzen mit zu Beginn steilem, dann plateauartigem Verlauf der Dosis-Wirkungskurve, die jedoch in keiner Dosierung die maximale Wirkung der echten Östrogene erreichen; Beispiel: Nafoxidin.

3.) "impeded" Östrogene

Substanzen mit einer flach ansteigenden Dosis-Wirkungskurve, die erst in hohen Dosen die Wirkung der echten Östrogene erreichen (46); Beispiel: Östriol, DMS.

4.) echte Antiöstrogene

Dieser Wirkstofftyp zeigt bei vorhandener Rezeptoraffinität keine östrogenen Wirkung. Ein Beispiel ist MER-25, das aller-

dings erst in einem sehr hohen Dosisbereich zu einer Hemmung der Östronwirkung führt (37). Über die Östrogenität von MER-25 liegen widersprüchliche Angaben vor. Während Terenius (37) bei dieser Verbindung am Mäuseuterus keine östrogenen Effekte beobachtet, berichtet Schulz (98) von solchen Wirkungen am Menschen.

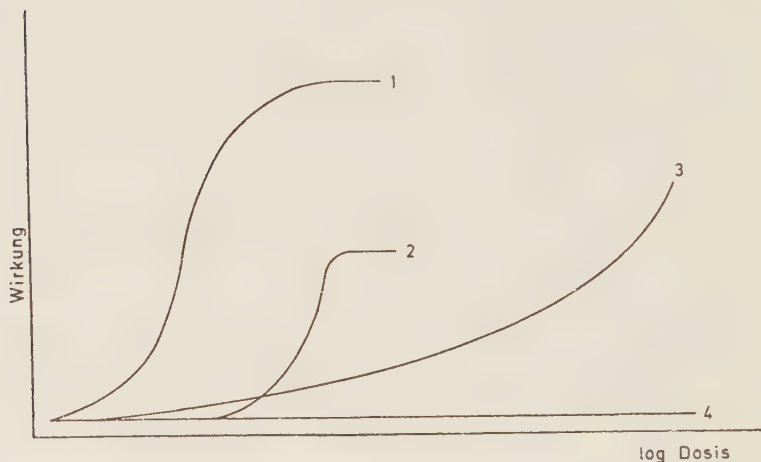


Abb. 5: Verlauf der Dosis-Wirkungskurven der Östrogenrezeptor-affinen Wirktypen 1-4

Die Wirktypen 2 und 3 können auch als partielle Antiöstrogene bezeichnet werden. Sie wirken antiöstrogen und mammatumorstimmend, da sie schwächere wachstumsstimulierende Effekte als Östradiol aufweisen.

Für eine weitere Prüfung an unserem Testsystem kommen Verbindungen des Wirktyps 2, 3 und 4 in Betracht.

Die Auffindung echter Antiöstrogene ist von Wichtigkeit, da östrogene Eigenschaften stets zu einer unerwünschten Stimulierung des Tumorstwachstums führen.

Von großem therapeutischen Interesse können auch Verbindungen sein, deren antiöstrogene Eigenschaften in einem Dosisbereich deutlich ausgeprägt sind, in dem noch keine merklichen östrogenen Effekte beobachtet werden. Über solche Substanzen, die bei unseren Untersuchungen aufgefunden wurden, wird in 2.2.1.3. berichtet.

Fehlende östrogene Eigenschaften bei deutlich vorhandener Rezeptoraffinität zeigen, daß es sich bei den vorliegenden Verbindungen um reine Antiöstrogene handelt.

"Partielle" und "impeded" Östrogene sind bereits bei der Bestimmung der uterotropen Wirkung nach Dorfman auffindbar. Partielle Östrogene geben sich auch bei der Bestimmung der kolpotropen Wirkung zu erkennen. Sie zeigen im Östrus neben den typischen verhornten Epithelzellen (Schollenstadium) einen erheblichen Anteil an Leukozyten (50 %).

Das Ausmaß der antiöstrogenen Wirkung, d.h. die Fähigkeit einer Verbindung, partiell oder vollständig den östrogenen Effekt eines Standardöstrogens wie Östron zu antagonisieren, wird in einem dritten Versuch bestimmt. Das Verfahren ist das gleiche wie bei der vorstehend beschriebenen Bestimmung der östrogenen Wirkung nach Dorfman.

Bekannte, in der Tumorchemotherapie erprobte Antiöstrogene wie Nafoxidin, führen maximal zu einer 50 %igen Hemmung des Östron-stimulierten Uteruswachstums.

Bei einigen Verbindungen, die sich durch hohe Rezeptoraffinität und nur schwache östrogene Wirkung auszeichnen, also bei "partiellen" oder "impeded" Östrogenen, beobachtet man überraschenderweise nur geringe Östrogenantagonistische Effekte. Die Ursache schwacher östrogenen und antiöstrogenen Eigenschaften wird von Terenius (36) bei dem von ihm untersuchten meso-Butöstrol auf die hohe Reversibilität der Rezeptorbindung zurückgeführt.

Wegen der Bedeutung der Reversibilität der Inhibitor-Rezeptorbindung für das Ausmaß der mammatumورهemmenden Wirkung wurde in Anlehnung an die Methode von Rochefort und Capony (39) ein Reversibilitätsexperiment als 4. Beurteilungskriterium in das Testsystem aufgenommen.

Geringe antiöstrogene Eigenschaften bei Verbindungen mit hoher Rezeptoraffinität konnten wir in vielen Fällen mit einer hohen Reversibilität der Inhibitor-Rezeptor-Bindung erklären.

Die als antiöstrogen wirksam befundenen Substanzen werden weiter am DMBA-induzierten hormonabhängigen Mammacarcinom der SD-Ratte geprüft; sie zeigen in allen Fällen eine ihrer antiöstrogenen Potenz entsprechende Tumorstärke. Substanzen mit relativ hoher Rezeptoraffinität (wie sie vereinzelt in der Klasse der 1,2-Diphenyl-äthylendiamine und der 4,5-Di-(4'-hydroxyphenyl)-imidazole gefunden werden), die sich weder durch eine östrogene noch durch eine antiöstrogene Wirkung auszeichnen, wurden abweichend vom vorliegenden Testverfahren am hormonabhängigen Mammatumorstärke geprüft und führten in einigen Fällen zu einem verzögerten Tumorstärke. Der Wirkungsmechanismus dieser Verbindungsklasse ist noch ungeklärt.

Der DMBA-induzierte hormonabhängige Mammatumorstärke der SD-Ratte erfordert bei der Testung von Versuchssubstanzen große Tierzahlen. Gründe sind 1) das uneinheitliche Wachstumsverhalten der einzelnen Tumoren - es werden forciert wachsende, statische und regressive Tumoren beobachtet - und 2) ein in den Versuchsgruppen oft unterschiedlicher Anteil hormonunabhängiger Tumoren.

Daher wurde bei dem hier entwickelten Testsystem eine Vorauswahl mit endokrinologischen Methoden dem Mammatumorstärkeversuch vorangestellt. Auf das DMBA-induzierte Mammacarcinom der SD-Ratte kann wegen seines, dem menschlichen hormonabhängigen Mammacarcinom gleichartigen Verhaltens gegenüber endokriner Therapie bei der Beurteilung einer Prüfsubstanz nicht verzichtet werden.

Verbindungen mit mammatumorstärkhemmenden Eigenschaften werden weiterhin auf cytostatische Wirkungsqualitäten geprüft. Östrogenrezeptor-affine Cytostatica werden dem gleichen Testsystem wie Anti-östrogene unterworfen, doch erfolgt hier eine weitere Prüfung auf cytostatische Eigenschaften auch bei einem negativen Ausfall der endokrinologischen Versuche. Bei dem auf den Mammatumorstärkeversuch folgenden Test wird die Substanz auf ihre cytostatische Wirkung in vitro unter Verwendung von Walker-256-Carcinosarkomzellen geprüft. Der

%-Anteil toter Zellen wird auf Grund ihrer Anfärbbbarkeit mit Trypanblau ermittelt. Um den Angriffspunkt dieser Stoffe im Zellstoffwechsel zu ermitteln, wird die Beeinflussung der DNA-, RNA- und Proteinsynthese durch die Bestimmung der Inkorporation von ^3H -Thymin, ^3H -Uridin und ^3H -Leucin geprüft.

Nach Untersuchungen von Volm (115) mit alkylierenden Cytostatica kann aus der Hemmung der RNA-Synthese auf mögliche Antitumorwirkungen in vivo geschlossen werden. Das Ausmaß der ^3H -Uridin-Einbauhemmung und der Antitumorwirkung korrelieren.

Untersuchungen über cytocide Eigenschaften wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit auch deshalb mit Stoffen der Verbindungstypen Ia, IIa, Va, Vb und VII durchgeführt, da von den synthetischen Östrogenen Diäthylstilböstrol und Hexöstrol solche Eigenschaften beschrieben sind und als mögliche Ursache der Antitumorwirkung bei hochdosierter Hexöstrol- und Diäthylstilböstroltherapie des Mammacarcinoms genannt werden (68, 90).

Zeichnet sich eine Substanz durch cytocide Eigenschaften aus, so erfolgt eine weitere Bewertung durch Testung an einem Spektrum hormonunabhängiger Transplantationstumoren.

2.2. Versuchsergebnisse

2.2.1. Entwicklung antiöstrogener Verbindungen aus Diäthylstilb- östrol und Hexöstrol: stellungsisomere 2,2'-, 3,3'- und 4,4'-Dihydroxy- α,β -diäthylstilbene und 3,4-Di-(2'-, 3'- 4'-hydroxyphenyl)-hexane

2.2.1.1. Bestimmung der Dissoziationskonstanten K_i

4,4'-DES (Verb.-Nr. 10), 3,3'-DES (Verb.Nr. 9) und 2,2'-DES (Verb. Nr. 8) hemmen kompetitiv die Östradiol-Rezeptor-Wechselbeziehung (s. Abb. 6-8).

Die Dissoziationskonstanten nehmen in der Reihenfolge 4,4'- < 3,3'- <<< 2,2'-DES zu (s. Tab. 1).

Versuche mit 3,3'-DES an Cytosolen aus DMBA-induzierten Mammatumoren der SD-Ratte führten zu gleichartigen Ergebnissen ($K_i = 1,3 \times 10^{-8}$ M).

Die Dissoziationskonstanten K_i der isomeren Hexöstrole (Verb.Nr. 1-3) sind denen der isomeren Diäthylstilböstrole ähnlich (4,4'- < 3,3'- << 2,2'-HES, s. Tab. 2). Die Verbindungen 1 - 3 hemmen kompetitiv die Östradiol-Rezeptor-Wechselbeziehung (s. Abb. 9, 10). Die Dissoziationskonstante für Nafoxidin*, das als Vergleichssubstanz herangezogen wurde, stimmt mit den von Geynet (55) gemessenen Werten ($K_i = 2 \times 10^{-8}$ M bis 4×10^{-8} M) überein (s. Tab. 3). Der von Rochefort (39) ermittelte kompetitive Hemmtyp konnte bestätigt werden (s. Abb. 11).

* Wir danken der Fa. UPJOHN, Heppenheim, für die freundliche Überlassung der Versuchssubstanz.

Tabelle 1: In vitro-Hemmung der Östradiol-Rezeptor-Wechselbeziehung durch 2,2'-, 3,3'- bzw. 4,4'-Dihydroxy- α,β -diäthylstilbene (Verb. Nr. 8 - 10): Dissoziationskonstanten der Hemmstoff-Rezeptorkomplexe (K_i) und des Östradiol-Rezeptorkomplexes (K_d).

Auswertung: nach Lineweaver-Burk

Rezeptorquelle: Kalbsuterus

Inkubationsdauer: 20 Stunden bei 0°C

Verb.Nr.	10	9	8
$K_i \pm V \cdot M$	$1,2 \pm 0,9 \times 10^{-9}$	$6,4 \pm 0,7 \times 10^{-9}$	$2,7 \pm 0,2 \times 10^{-6}$
$K_d \pm V \cdot M$	$2,7 \pm 0,5 \times 10^{-10}$	$5,6 \pm 2,5 \times 10^{-10}$	$4,6 \pm 0,9 \times 10^{-10}$
Regressionsgerade ohne Inhibitor**	$y = 0,26 x + 9,51$	$y = 0,42 x + 7,4$	$y = 0,45 x + 9,76$
Korrelationskoeffizient	0,977	1,0	0,986
Anzahl der Wertepaare	42	42	42
Regressionsgerade mit Inhibitor**	$y = 0,69 x + 10,25$	$y = 1,73 x + 7,73$	$y = 3,71 x + 7,3$
Korrelationskoeffizient	0,980	0,990	0,997
Anzahl der Wertepaare	36	36	36
Proteingehalt des Cytosols (mg/ml)	5,2	4,8	5,5
Rezeptorgehalt (fMol/mg Protein)	1058	1406	931

*: V = Vertrauensbereich ($\alpha = 0,05$)

** : $X = \frac{1}{\text{freies Östradiol}} \left(\frac{1}{M} \times 10^8 \right)$; $y = \frac{1}{\text{gebundenes Östradiol}} \left(\frac{1}{M} \times 10^8 \right)$

Tabelle 2: In vitro-Hemmung der Östradiol-Rezeptor-Wechselbeziehung durch 3,4-Di-(2'-, 3'- bzw. 4'-hydroxyphenyl)-hexan (Verb.Nr. 1 - 3). Dissoziationskonstanten der Hemmstoff-Rezeptorkomplexe (K_i) und des Östradiol-Rezeptorkomplexes (K_d).

Auswertung: nach Lineweaver-Burk

Rezeptorquelle: Kalbsuterus

Inkubationsdauer: 20 Stunden bei 0°C

Verb.Nr.	3	2	1
$K_i \pm v \cdot M$	$1,6 \pm 0,2 \times 10^{-9}$	$5,0 \pm 0,7 \times 10^{-9}$	$6,6 \pm 0,5 \times 10^{-7}$
$K_d \pm v \cdot M$	$5,6 \pm 2,5 \times 10^{-10}$	$5,6 \pm 2,5 \times 10^{-10}$	$4,5 \pm 0,5 \times 10^{-10}$
Regressionsgerade ohne Inhibitor**	$y = 0,42 x + 7,39$	$y = 0,42 x + 7,39$	$y = 0,7 x + 15,5$
Korrelationskoeffizient	1,0	1,0	0,988
Anzahl der Wertepaare	42	42	42
Regressionsgerade mit Inhibitor**	$y = 0,93 x + 7,38$	$y = 0,59 x + 7,74$	$y = 2,82 x + 14,1$
Korrelationskoeffizient	0,998	1,0	0,999
Anzahl der Wertepaare	36	36	36
Proteingehalt d. Cytosols (mg/ml)	4,8	4,8	4,4
Rezeptorgehalt (fMol/mg Protein)	1406	1406	767

*: V = Vertrauensbereich ($\alpha = 0,05$)

** : $x = \frac{1}{\text{freies Östradiol}} \left(\frac{1}{M} \times 10^8 \right)$; $y = \frac{1}{\text{gebundenes Östradiol}} \left(\frac{1}{M} \times 10^8 \right)$.

Tabelle 3: In vitro-Hemmung der Östradiol-Rezeptor-Wechselbeziehung durch

Nafoxidin:

Dissoziationskonstanten der Hemmstoff-Rezeptorkomplexe (K_i) und des ^3H -Östradiol-Rezeptorkomplexes (K_d).

Auswertung: nach Lineweaver-Burk

Rezeptorquelle: Kalbsuterus

Inkubationszeit: 20 Stunden bei 0°C

Verb. Nr.	Nafoxidin
$K_i \pm V^* M$	$1,2 \pm 0,5 \times 10^{-8}$
$K_d \pm V^* M$	$1,5 \pm 0,7 \times 10^{-10}$
Regressionsgerade ohne Inhibitor**	$y = 0,25 x + 16,85$
Korrelationskoeffizient	0,952
Anzahl der Wertepaare	36
Regressionsgerade mit Inhibitor**	$y = 4,62 x + 16,13$
Korrelationskoeffizient	0,971
Anzahl der Wertepaare	36
Proteingehalt des Cytosols (mg/ml)	4,0
Rezeptorgehalt (fMol/mg Protein)	741

*: V = Vertrauensbereich ($\alpha = 0,05$)**: $X = \frac{1}{\text{freies Östradiol}} \left(\frac{1}{M} \times 10^8 \right)$ $y = \frac{1}{\text{gebundenes Östradiol}} \left(\frac{1}{M} \times 10^8 \right)$

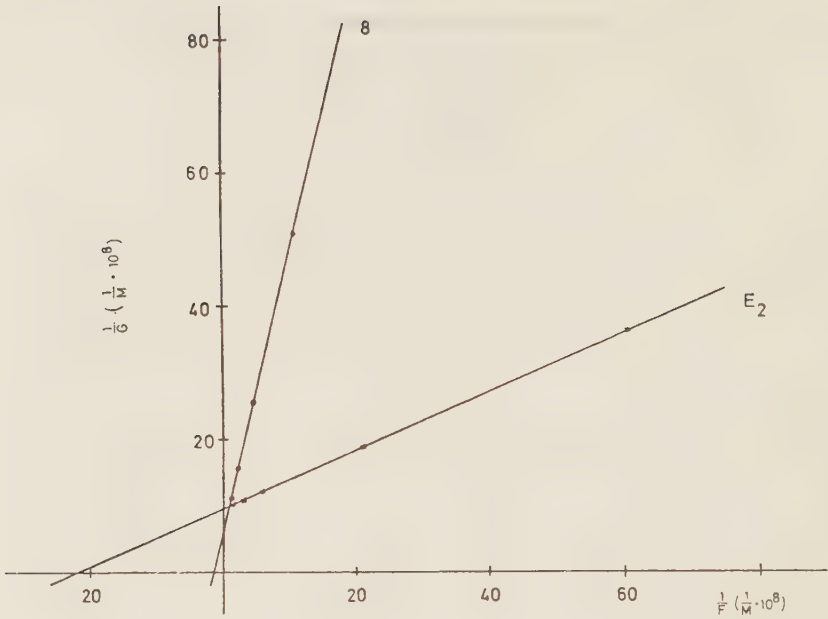


Abb. 6: Kompetitive Hemmung der Östradiol-Rezeptor-Wechselbeziehung durch
2,2'-Dihydroxy- α, β -diäthylstilben (Verb.Nr. 8)

Lineweaver-Burk-System;

Substrat: ^3H -Östradiol (E_2);

Rezeptorquelle: Kalbsuterus;

Inkubationsdauer: 20 h bei 0°C

Hemmstoffkonzentration: $2,0 \times 10^{-5}$ Mol/l

Abszisse: $\frac{1}{\text{freies } ^3\text{H-Östradiol}}$

Ordinate: $\frac{1}{\text{gebundenes } ^3\text{H-Östradiol}}$

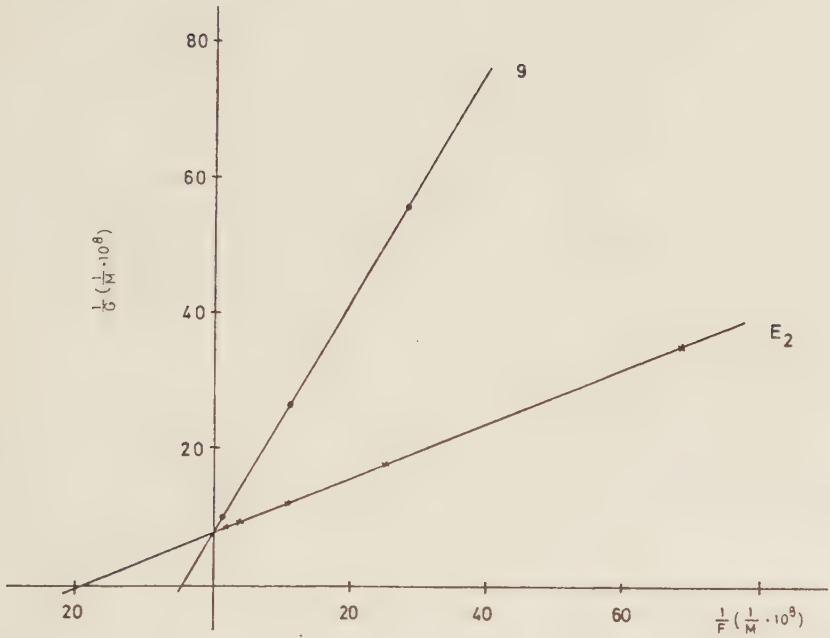


Abb. 7: Kompetitive Hemmung der Östradiol-Rezeptor-Wechselbeziehung durch
3,3'-Dihydroxy- α,β -diäthylstilben (Verb.Nr. 9)

Lineweaver-Burk-System;

Substrat: ^3H -Östradiol (E_2);

Rezeptorquelle: Kalbsuterus

Inkubationsdauer: 20 h bei 0°C;

Hemmstoffkonzentration: $2,0 \times 10^{-8}$ Mol/l

Abszisse: $\frac{1}{\text{freies } ^3\text{H-Östradiol}}$

Ordinate: $\frac{1}{\text{gebundenes } ^3\text{H-Östradiol}}$

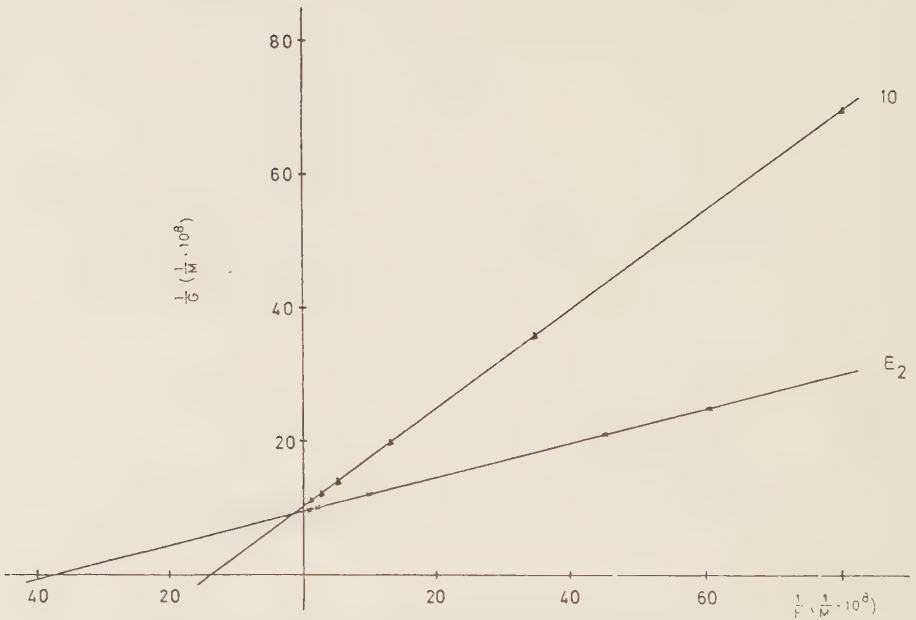


Abb. 8: Kompetitive Hemmung der Östradiol-Rezeptor-Wechselbeziehung durch 4,4'-Dihydroxy- α,β -diäthylstilben (Verb.Nr. 10)

Lineweaver-Burk-System;

Substrat: ^3H -Östradiol (E_2);

Rezeptorquelle: Kalbsuterus;

Inkubationsdauer: 20 h bei 0°C ;

Hemmstoffkonzentration: $2,0 \times 10^{-9} \text{ Mol/l}$

Abszisse: $\frac{1}{\text{freies } ^3\text{H-Östradiol}}$

Ordinate: $\frac{1}{\text{gebundenes } ^3\text{H-Östradiol}}$

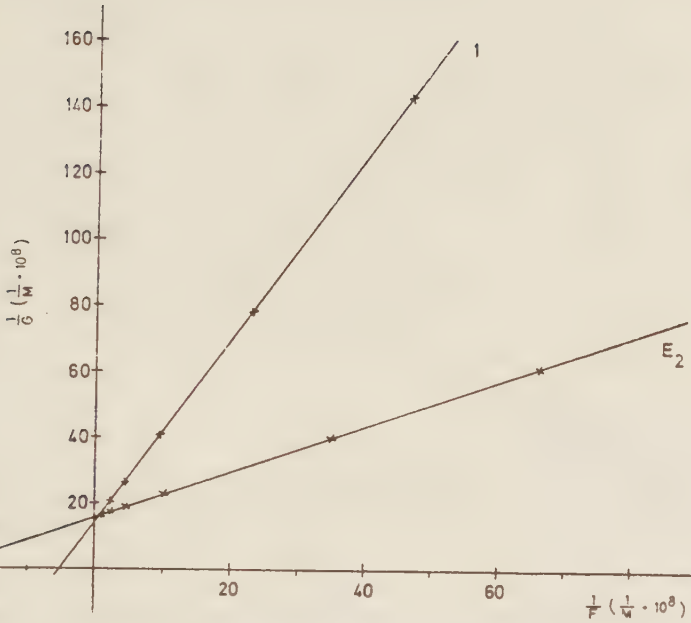


Abb. 9: Kompetitive Hemmung der Östradiol-Rezeptor-Wechselbeziehung durch
 3,4-Di-(2'-hydroxyphenyl)-hexan (Verb.Nr. 1)
 Lineweaver-Burk-System;
 Substrat: ^3H -Östradiol (E_2);
 Rezeptorquelle: Kalbsuterus;
 Inkubationsdauer: 20 h bei 0°C ;
 Hemmstoffkonzentration: $2,0 \times 10^{-6}$ Mol/l

Abszisse: $\frac{1}{\text{freies } ^3\text{H-Östradiol}}$

Ordinate: $\frac{1}{\text{gebundenes } ^3\text{H-Östradiol}}$

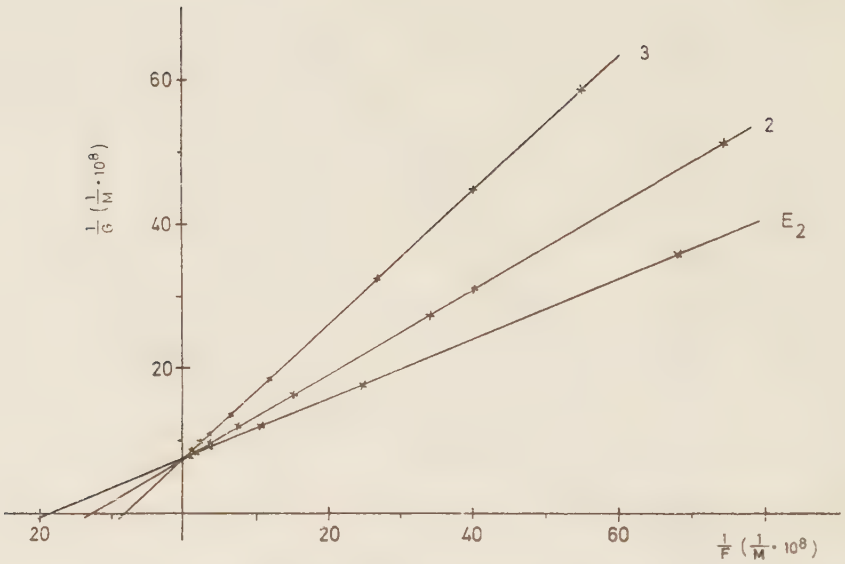


Abb. 10: Kompetitive Hemmung der Östradiol-Rezeptor-Wechselbeziehung durch

3,4-Di-(3'- bzw. 4'-hydroxyphenyl)-hexan (Verb.Nr. 2 und 3)

Lineweaver-Burk-System;

Substrat: ^3H -Östradiol (E_2);

Rezeptorquelle: Kalbsuterus;

Inkubationsdauer: 20 h bei 0°C ;

Hemmstoffkonzentrationen: $2,0 \times 10^{-9}$ Mol/l

Abszisse: $\frac{1}{\text{freies } ^3\text{H-Östradiol}}$

Ordinate: $\frac{1}{\text{gebundenes } ^3\text{H-Östradiol}}$

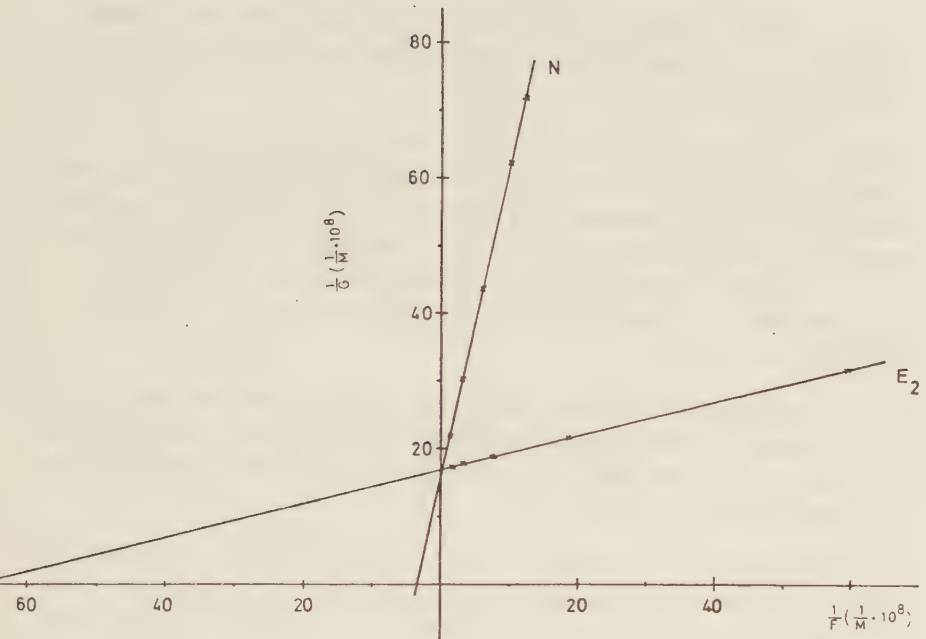


Abb. 11: Kompetitive Hemmung der Östradiol-Rezeptor-Wechselbeziehung durch

Nafoxidin (N);

Lineweaver-Burk-System;

Substrat: ³H-Östradiol (E₂);

Rezeptorquelle: Kalbsuterus;

Inkubationsdauer: 20 h bei 0°C;

Hemmstoffkonzentration: 2,0 × 10⁻⁷ Mol/l

Abszisse: $\frac{1}{\text{freies } ^3\text{H-Östradiol}}$

Ordinate: $\frac{1}{\text{gebundenes } ^3\text{H-Östradiol}}$

2.2.1.2 Bestimmung der uterotropen und kolpotropen Eigenschaften der stellungsisomeren Diäthylstilböstrole und Hexöstrole

Die Bestimmung erfolgte mit Hilfe des Dorfman- und des Allen-Doisy-Tests. Zur Methodik der Verfahren siehe experimenteller Teil 3.2. und 3.4.

2,2'-DES (Verb.Nr. 8) und 2,2'-HES (Verb.Nr. 1) sind echte Östrogene. Sie zeigen einen dem 4,4'-DES und 4,4'-HES parallelen Verlauf der Dosis-Wirkungskurve (s. Abb. 12, 13). Sie erreichen den maximalen uterotropen Effekt von 4,4'-DES und 4,4'-HES (s. Tab. 4, 5). Aus dem Abstand der Dosis-Wirkungsgeraden wurde die zu 4,4'-DES bzw. 4,4'-HES relative uterotrope Aktivität berechnet (s. Tab. 6, 7).

Die Vaginalabstriche ovariectomierter Mäuse zeigen bei den 2,2'-Verbindungen, entsprechend echten Östrogenen, eine volle Entwicklung des Scheidenepithels (verhornte kernlose Epithelzellen, keine Leukozyten) (s. Tab. 4, 5).

3,3'-DES (Verb.Nr. 9) und 3,3'-HES (Verb. Nr. 2) entsprechen aufgrund ihrer Dosis-Wirkungskurven dem 'impeded' Östrogen Östriol; sie erreichen aber, wie partielle Östrogene, nicht die 100 %ige Wirkung echter Östrogene (s. Abb. 14, 15 und Tab. 10, 11). Die relative uterotrope Aktivität, bezogen auf Östriol, beträgt für 3,3'-DES 0,103, für 3,3'-HES 0,121 (s. Tab. 10, 11).

In den Vaginalabstrichen der mit den 3,3'-Verbindungen behandelten ovariectomierten Mäuse befanden sich kernlose verhornte Epithelien; die Anzahl der Leukozyten sank jedoch nie unter 50 % (s. Tab. 8, 9).

Nafoxidin zeigt einen für einen partiellen Agonisten typischen Verlauf der Dosis-Wirkungskurve (s. Abb. 16). Es wurde in seinem uterotropen Verhalten mit 4,4'-DES verglichen (s. Tab. 13), obwohl nur der Beginn der Kurvenverläufe beider Substanzen übereinstimmt und Nafoxidin in keiner Dosierung den maximalen uterotropen Effekt des 4,4'-DES erreicht.

Die kolpotropen Eigenschaften von Nafoxidin sind mit denen von 3,3'-DES und 3,3'-HES vergleichbar (s. Tab. 12).

Tabelle 4: Uterotroper und kolpotroper Test:

Mittelwerte und Standardabweichungen der Wirkungsparameter und der Körpergewichte juveniler Mäuse bei subcutaner Gabe von 2,2'- und 4,4'-Dihydroxy- α , β -diäthylstilben (Verb.Nr. 8 und 10)

Verb.Nr.	Dosis* μ g	Tier- zahl	Körpergewicht g	uterotrope Wirkung**	kolpotrope Wirkung***
0	0	7	14,2 $\pm$ 1,1	11,4 $\pm$ 1,4	0
10	<u>0,04</u>	7	14,7 $\pm$ 1,4	13,1 $\pm$ 1,5	x
	<u>0,08</u>	7	13,3 $\pm$ 1,4	23,2 $\pm$ 2,9	y
	<u>0,16</u>	7	13,0 $\pm$ 1,8	32,7 $\pm$ 4,5	1
	0,32	7	14,4 $\pm$ 1,3	35,5 $\pm$ 5,1	1
	0,64	7	14,8 $\pm$ 1,8	45,7 $\pm$ 4,5	1
	1,28	7	14,6 $\pm$ 1,2	49,3 $\pm$ 7,1	1
8	37,5	7	14,5 $\pm$ 1,0	12,4 $\pm$ 1,8	0
	<u>75,0</u>	7	14,7 $\pm$ 2,0	15,4 $\pm$ 2,6	x
	<u>150</u>	7	14,6 $\pm$ 1,1	23,7 $\pm$ 2,5	y
	<u>300</u>	7	13,4 $\pm$ 1,6	33,2 $\pm$ 4,1	1
	600	7	14,2 $\pm$ 1,8	40,2 $\pm$ 2,6	1
	1200	7	13,3 $\pm$ 0,9	44,5 $\pm$ 3,7	1

*: Gesamtdosis pro Tier und Versuch; Dosis wurde zur Aktivitätsberechnung verwendet.

**: $\frac{\text{Uterustrockengewicht (mg)}}{\text{Körpergewicht (g)}} \times 100$

***: Klassifizierung siehe Methodik

Tabelle 5: Uterotroper und kolpotroper Test:

Mittelwerte und Standardabweichungen der Wirkungsparameter und der Körpergewichte juveniler Mäuse bei subcutaner Gabe von 3,4-Di-(2'- bzw. 4'-hydroxyphenyl)-hexan (Verb.Nr. 1 und 3)

Verb.Nr.	Dosis* µg	Tier- zahl	Körpergewicht g	uterotrope Wirkung**	kolpotrope Wirkung***
0	0	7	13,3 $\pm$ 0,9	9,8 $\pm$ 0,7	0
3	<u>0,04</u>	7	13,0 $\pm$ 1,4	17,3 $\pm$ 2,7	x
	<u>0,08</u>	7	13,1 $\pm$ 1,1	22,4 $\pm$ 2,2	y
	<u>0,16</u>	7	14,6 $\pm$ 2,0	31,6 $\pm$ 4,5	1
	<u>0,32</u>	7	13,1 $\pm$ 1,7	38,8 $\pm$ 5,2	1
	0,64	7	13,5 $\pm$ 1,7	46,2 $\pm$ 4,7	1
	1,28	7	13,2 $\pm$ 1,6	45,5 $\pm$ 4,2	1
1	4,687	7	13,9 $\pm$ 1,4	12,5 $\pm$ 0,9	0
	9,375	7	14,2 $\pm$ 1,0	16,0 $\pm$ 2,0	x
	<u>18,75</u>	7	13,8 $\pm$ 1,2	30,8 $\pm$ 7,3	1
	<u>37,5</u>	7	13,6 $\pm$ 1,5	38,8 $\pm$ 4,6	1
	<u>75,0</u>	7	13,2 $\pm$ 1,4	45,1 $\pm$ 3,7	1
	150,0	7	12,9 $\pm$ 1,6	43,5 $\pm$ 6,5	1

*: Gesamtdosis pro Tier und Versuch; Dosis wurde zur Aktivitätsberechnung verwendet.

** : $\frac{\text{Uterustrockengewicht (mg)}}{\text{Körpergewicht (g)}} \times 100$

***: Klassifizierung siehe Methodik

Tabelle 6: Vergleich der uterotropen Aktivität von 2,2'-Dihydroxy- α,β -diäthylstilben (Verb.Nr. 8) mit 4,4'-Dihydroxy- α,β -diäthylstilben (Verb.Nr. 10) als Standard.
Zur Methodik der Aktivitätsberechnung siehe Cavalli-Sforza (103).

relative Aktivität	Vertrauensbereich ($\alpha = 0,05$)	mittlere Regression	Präzision λ	Prüfung auf Parallelität F (P %)	Prüfung auf Linearität F (P %)	maximale uterotrope Wirkung * (P %)
$5,7 \times 10^{-4}$	$4,9 - 6,6 \times 10^{-4}$	30,465	0,102	0,32 (> 5)	3,59 (> 1)	87 (> 5)

*: Standard: Verb.Nr. 10 $1,28 \mu\text{g} = 100 \%$

Tabelle 7: Vergleich der uterotropen Aktivität von 3,4-Di-(2'-hydroxyphenyl)-hexan (Verb.Nr. 1) mit 3,4-Di-(4'-hydroxyphenyl)-hexan (Hexöstrol, Verb.Nr. 3) als Standard.
Zur Methodik der Aktivitätsberechnung siehe Cavalli-Sforza (103).

relative Aktivität	Vertrauensbereich ($\alpha = 0,05$)	mittlere Regression	Präzision λ	Prüfung auf Parallelität F (P %)	Prüfung auf Linearität F (P %)	maximale uterotrope Wirkung * (P %)
$6,8 \times 10^{-3}$	$5,4 - 8,6 \times 10^{-3}$	25,171	0,147	0,56 (> 5)	0,73 (> 5)	97 (> 5)

*: Standard: Verb.Nr. 3 $0,64 \mu\text{g} = 100 \%$

Tabelle 5: Uterotroper und kolpotroper Test:

Mittelwerte und Standardabweichungen der Wirkungsparameter und der Körpergewichte juveniler Mäuse bei subcutaner Gabe von 3,4-Di-(2'- bzw. 4'-hydroxyphenyl)-hexan (Verb.Nr. 1 und 3)

Verb.Nr.	Dosis* µg	Tier- zahl	Körpergewicht g	uterotrope Wirkung**	kolpotrope Wirkung***
0	0	7	13,3 $\pm$ 0,9	9,8 $\pm$ 0,7	0
3	<u>0,04</u>	7	13,0 $\pm$ 1,4	17,3 $\pm$ 2,7	x
	<u>0,08</u>	7	13,1 $\pm$ 1,1	22,4 $\pm$ 2,2	y
	<u>0,16</u>	7	14,6 $\pm$ 2,0	31,6 $\pm$ 4,5	1
	<u>0,32</u>	7	13,1 $\pm$ 1,7	38,8 $\pm$ 5,2	1
	0,64	7	13,5 $\pm$ 1,7	46,2 $\pm$ 4,7	1
	1,28	7	13,2 $\pm$ 1,6	45,5 $\pm$ 4,2	1
1	4,687	7	13,9 $\pm$ 1,4	12,5 $\pm$ 0,9	0
	9,375	7	14,2 $\pm$ 1,0	16,0 $\pm$ 2,0	x
	<u>18,75</u>	7	13,8 $\pm$ 1,2	30,8 $\pm$ 7,3	1
	<u>37,5</u>	7	13,6 $\pm$ 1,5	38,8 $\pm$ 4,6	1
	<u>75,0</u>	7	13,2 $\pm$ 1,4	45,1 $\pm$ 3,7	1
	150,0	7	12,9 $\pm$ 1,6	43,5 $\pm$ 6,5	1

*: Gesamtdosis pro Tier und Versuch; Dosis wurde zur Aktivitätsberechnung verwendet.

** : $\frac{\text{Uterustrockengewicht (mg)}}{\text{Körpergewicht (g)}} \times 100$

***: Klassifizierung siehe Methodik

Tabelle 6: Vergleich der uterotropen Aktivität von 2,2'-Dihydroxy- α,β -diäthylstilben (Verb.Nr. 8) mit 4,4'-Dihydroxy- α,β -diäthylstilben (Verb.Nr. 10) als Standard.
Zur Methodik der Aktivitätsberechnung siehe Cavalli-Sforza (103).

relative Aktivität	Vertrauensbereich ($\alpha = 0,05$)	mittlere Regression	Präzision λ	Prüfung auf Parallelität F (P %)	Prüfung auf Linearität F (P %)	maximale uterotrope Wirkung * (P %)
$5,7 \times 10^{-4}$	$4,9 - 6,6 \times 10^{-4}$	30,465	0,102	0,32 (> 5)	3,59 (> 1)	87 (> 5)

*: Standard: Verb.Nr. 10 $1,28 \mu\text{g} = 100 \%$

Tabelle 7: Vergleich der uterotropen Aktivität von 3,4-Di-(2'-hydroxyphenyl)-hexan (Verb.Nr. 1) mit 3,4-Di-(4'-hydroxyphenyl)-hexan (Hexöstrol, Verb.Nr. 3) als Standard.
Zur Methodik der Aktivitätsberechnung siehe Cavalli-Sforza (103).

relative Aktivität	Vertrauensbereich ($\alpha = 0,05$)	mittlere Regression	Präzision λ	Prüfung auf Parallelität F (P %)	Prüfung auf Linearität F (P %)	maximale uterotrope Wirkung * (P %)
$6,8 \times 10^{-3}$	$5,4 - 8,6 \times 10^{-3}$	25,171	0,147	0,56 (> 5)	0,73 (> 5)	97 (> 5)

*: Standard: Verb.Nr. 3 $0,64 \mu\text{g} = 100 \%$

Tabelle 8: Uterotroper und kolpotroper Test:

Mittelwerte und Standardabweichungen der Wirkungsparameter und der Körpergewichte juveniler Mäuse bei subcutaner Gabe von Östron, Östriol und 3,4-Di-(3'-hydroxyphenyl)-hexan (Verb.Nr. 2)

Verb.Nr.	Dosis* µg	Tier- zahl	Körpergewicht g	uterotrope Wirkung**	kolpotrope Wirkung***
0	0	10	15,9 $\pm$ 1,7	10,7 $\pm$ 1,8	0
Östron	0,04	10	15,4 $\pm$ 1,3	13,0 $\pm$ 1,1	x
	0,08	10	15,2 $\pm$ 1,3	19,1 $\pm$ 2,3	y
	0,16	10	15,5 $\pm$ 1,1	27,8 $\pm$ 4,1	1
	0,32	10	15,7 $\pm$ 1,6	35,4 $\pm$ 2,9	1
	0,64	10	15,5 $\pm$ 1,4	40,6 $\pm$ 4,8	1
	1,28	10	16,0 $\pm$ 1,5	39,5 $\pm$ 4,1	1
Östriol	0,3	10	15,6 $\pm$ 2,3	13,6 $\pm$ 1,8	-
	3,0	10	15,7 $\pm$ 1,4	15,1 $\pm$ 2,0	-
	<u>9,0</u>	10	15,4 $\pm$ 1,9	18,6 $\pm$ 1,6	-
	<u>30</u>	10	16,2 $\pm$ 2,0	31,1 $\pm$ 5,7	-
	300	10	15,1 $\pm$ 2,1	33,9 $\pm$ 5,5	-
2	2,4	10	15,7 $\pm$ 1,5	11,8 $\pm$ 2,1	0
	24	10	14,5 $\pm$ 0,9	14,4 $\pm$ 1,1	0
	<u>72</u>	10	15,6 $\pm$ 1,4	18,5 $\pm$ 3,5	0
	<u>240</u>	10	15,4 $\pm$ 1,8	30,5 $\pm$ 4,0	z
	2400	10	15,6 $\pm$ 1,0	30,8 $\pm$ 4,9	z

*: Gesamtdosis pro Tier und Versuch; Dosis wurde zur Aktivitätsberechnung verwendet.

** : $\frac{\text{Uterustrockengewicht (mg)}}{\text{Körpergewicht (g)}} \times 100$

***: Klassifizierung siehe Methodik

Tabelle 9: Uterotroper und kolpotroper Test:

Mittelwerte und Standardabweichungen der Wirkungsparameter und der Körpergewichte juveniler Mäuse bei subcutaner Gabe von 3,3'-Dihydroxy- α ,8-diäthylstilben (Verb.Nr. 9), Östron und Östriol.

Verb.Nr.	Dosis* μg	Tier- zahl	Körpergewicht g	uterotrope Wirkung**	kolpotrope Wirkung***
0	0	10	$15,9 \pm 1,7$	$10,7 \pm 1,8$	0
Östron	0,04	10	$15,4 \pm 1,3$	$13,0 \pm 1,1$	x
	0,08	10	$15,2 \pm 1,3$	$19,1 \pm 2,3$	y
	0,16	10	$15,5 \pm 1,1$	$27,8 \pm 4,1$	1
	0,32	10	$15,7 \pm 1,6$	$35,4 \pm 2,9$	1
	0,64	10	$15,5 \pm 1,4$	$40,6 \pm 4,8$	1
	1,28	10	$16,0 \pm 1,5$	$39,5 \pm 4,1$	1
Östriol	0,3	10	$15,6 \pm 2,3$	$13,6 \pm 1,8$	-
	3,0	10	$15,7 \pm 1,4$	$15,1 \pm 2,0$	-
	<u>9,0</u>	10	$15,4 \pm 1,9$	$18,6 \pm 1,6$	-
	<u>30</u>	10	$16,2 \pm 2,0$	$31,1 \pm 5,7$	-
	300	10	$15,1 \pm 2,1$	$33,9 \pm 5,5$	-
9	2,4	10	$15,2 \pm 1,6$	$10,5 \pm 3,3$	0
	24,0	10	$15,5 \pm 1,5$	$13,1 \pm 2,0$	0
	<u>72</u>	10	$15,3 \pm 2,0$	$17,3 \pm 1,9$	0
	<u>240</u>	10	$17,3 \pm 2,0$	$28,7 \pm 3,9$	z
	2400	10	$15,1 \pm 1,8$	$29,2 \pm 4,8$	z

*: Gesamtdosis pro Tier und Versuch; Dosis wurde zur Aktivitätsberechnung verwendet.

** $\frac{\text{Uterustrockengewicht (mg)}}{\text{Körpergewicht (g)}} \times 100$

***: Klassifizierung siehe Methodik

Tabelle 10: Vergleich der uterotropen Aktivität von 3,3'-Dihydroxy- α , β -diäthylstilben (Verb.Nr. 9) mit Östriol bzw. Östron als Standard.

Zur Methodik der Aktivitätsberechnung siehe Borth und Mitarb. (104).

relative Aktivität***	Vertrauensbereich ($\alpha = 0,05$)	mittlere Regression	Präzision λ	Prüfung auf Parallelität F (P %)	maximale uterotrope Wirkung* (P %)	maximale uterotrope Wirkung** (P %)
0,103	0,077 - 0,136	23,0	0,187	0,38 (> 5)	62 (< 5)	79 (> 5)

*: Standard: Östron 0,64 μg = 100 %

** : Standard: Östriol 300 μg = 100 %

***: bezogen auf Östriol

Tabelle 11: Vergleich der uterotropen Aktivität von 3,4-Di-(3'-hydroxyphenyl)-hexan (Verb.Nr. 2) mit Östriol bzw. Östron als Standard.

Zur Methodik der Aktivitätsberechnung siehe Borth und Mitarbeiter (104).

relative Aktivität*	Vertrauensbereich ($\alpha = 0,05$)	mittlere Regression	Präzision λ	Prüfung auf Parallelität F (P %)	maximale uterotrope Wirkung** (P %)	maximale uterotrope Wirkung*** (P %)
0,121	0,096 - 0,152	23,4	0,152	0,25 (> 5)	67 (< 5)	87 (> 5)

*: bezogen auf Östriol

** : Standard: Östron 0,64 μg = 100 %

***: Standard: Östriol 300 μg = 100 %

Tabelle 12: Uterotroper und kolpotroper Test:

Mittelwerte und Standardabweichungen der Wirkungsparameter und der Körpergewichte juveniler Mäuse bei subcutaner Gabe von Nafoxidin (N) und 4,4'-Dihydroxy- α ,8-diäthylstilben (Verb.Nr. 10).

Verb.Nr.	Dosis* μg	Tier- zahl	Körpergewicht g	uterotrope Wirkung**	kolpotrope Wirkung***
0	0	7	$13,1 \pm 1,5$	$10,5 \pm 1,6$	0
10	0,04	7	$13,1 \pm 1,2$	$12,0 \pm 2,2$	x
	<u>0,08</u>	7	$13,9 \pm 1,1$	$14,4 \pm 1,9$	y
	<u>0,16</u>	7	$13,2 \pm 0,6$	$26,8 \pm 3,1$	1
	<u>0,32</u>	7	$14,0 \pm 1,0$	$33,4 \pm 3,6$	1
	0,64	7	$14,0 \pm 1,1$	$39,8 \pm 4,0$	1
	1,28	7	$13,6 \pm 2,0$	$37,3 \pm 3,5$	1
N	0,3	7	$13,2 \pm 1,1$	$11,5 \pm 1,3$	x
	0,6	7	$13,5 \pm 0,9$	$12,1 \pm 1,1$	x
	<u>1,5</u>	7	$13,6 \pm 1,1$	$19,1 \pm 4,5$	x
	<u>3,0</u>	7	$13,8 \pm 0,8$	$26,9 \pm 2,3$	z
	9,0	7	$14,2 \pm 1,2$	$25,5 \pm 2,5$	z
	30,0	7	$14,0 \pm 1,3$	$27,0 \pm 2,2$	z
	150	7	$12,9 \pm 1,1$	$24,9 \pm 2,7$	z

*: Gesamtdosis pro Tier und Versuch; Dosis wurde zur Aktivitätsberechnung verwendet.

** $\frac{\text{Uterustrockengewicht (mg)}}{\text{Körpergewicht (g)}} \times 100$

***: Klassifizierung siehe Methodik

Tabelle 13: Vergleich der uterotropen Aktivität von Nafoxidin mit 4,4'-Dihydroxy- α,β -diäthylstilben (Verb.Nr. 10) als Standard.

Zur Methodik der Aktivitätsberechnung siehe Cavalli-Sforza (103).

relative Aktivität	Vertrauensbereich ($\alpha = 0,05$)	mittlere Regression	Präzision λ	Prüfung auf Parallelität F (P %)	Prüfung auf Linearität F (P %)	maximale uterotrope Wirkung* (P %)
0,128	0,088 - 0,154	30,3	0,103	0,84 (> 5)	2,47 (> 5)	56,3 (< 5)

*: Standard: Verb.Nr. 10 0,64 μg = 100 %

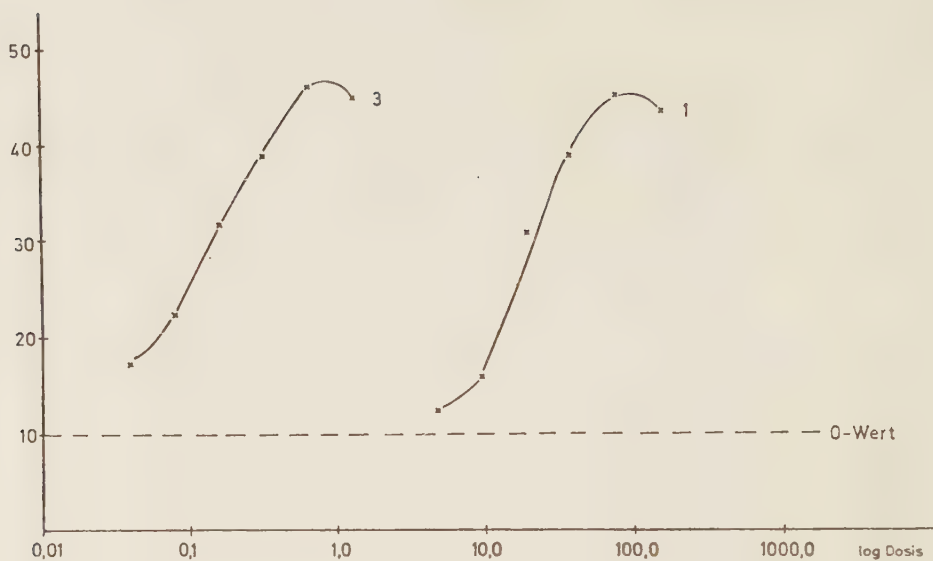


Abb. 12: Wirkung von 3,4-Di-(2'- bzw. 4'-hydroxyphenyl)-hexan (Verb.Nr. 1 und 3) auf das Uteruswachstum der juvenilen Maus.

Abszisse: Dosis (µg) pro Tier und Versuch

Ordinate: $\frac{\text{Uterustrockengewicht (mg)}}{\text{Körpergewicht (g)}} \times 100$

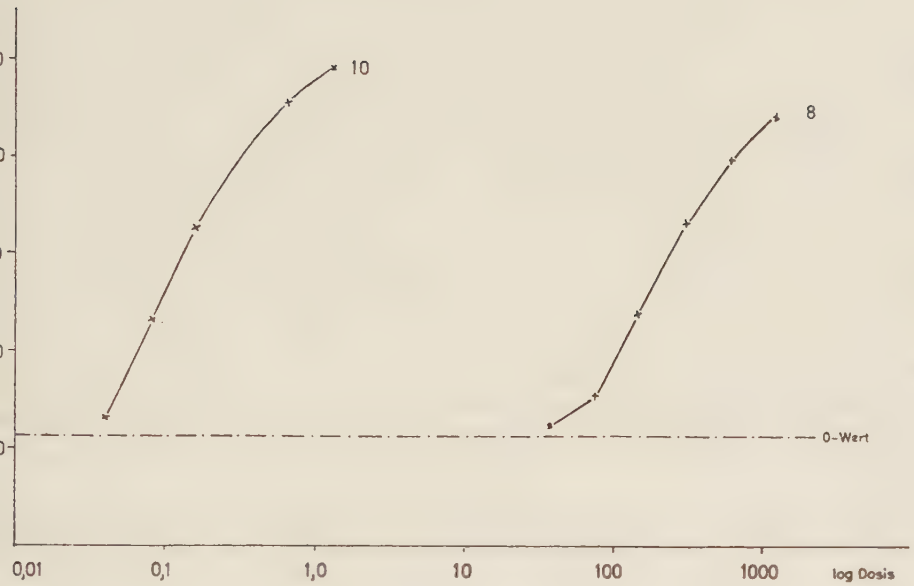


Abb. 13: Wirkung von 2,2'- bzw. 4,4'-Dihydroxy- α ,8-diäthylstilben
(Verb. Nr. 8 - 10) auf das Uteruswachstum der juvenilen Maus.

Abszisse: Dosis (μ g) pro Tier und Versuch

Ordinate: $\frac{\text{Uterustrockengewicht (mg)}}{\text{Körpergewicht (g)}} \times 100$

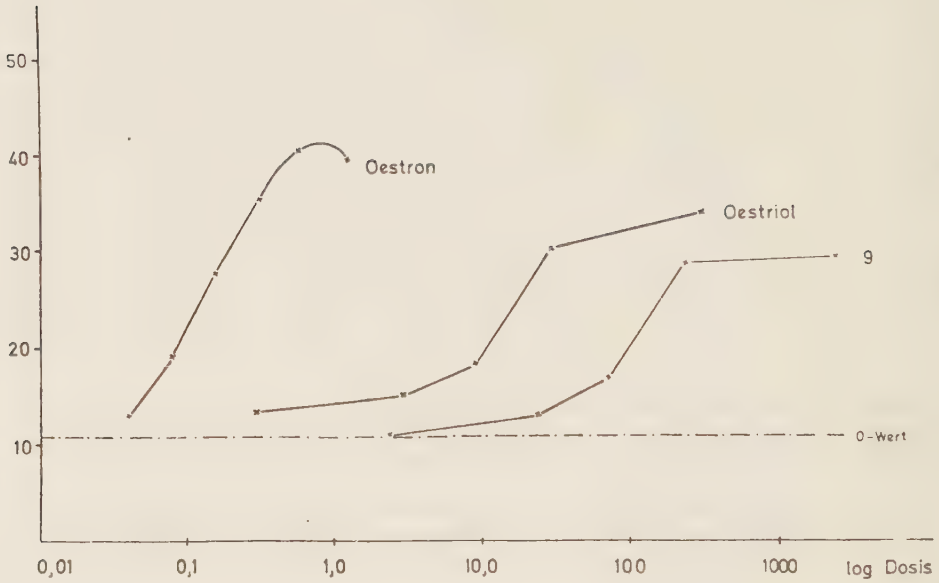


Abb. 14: Wirkung von 3,3'-Dihydroxy- α,β -diäthylstilben (Verb.Nr. 9), Östron und Östriol auf das Uteruswachstum der juvenilen Maus.

Abszisse: Dosis (μg) pro Tier und Versuch

Ordinate: $\frac{\text{Uterustrockengewicht (mg)}}{\text{Körpergewicht (g)}} \times 100$

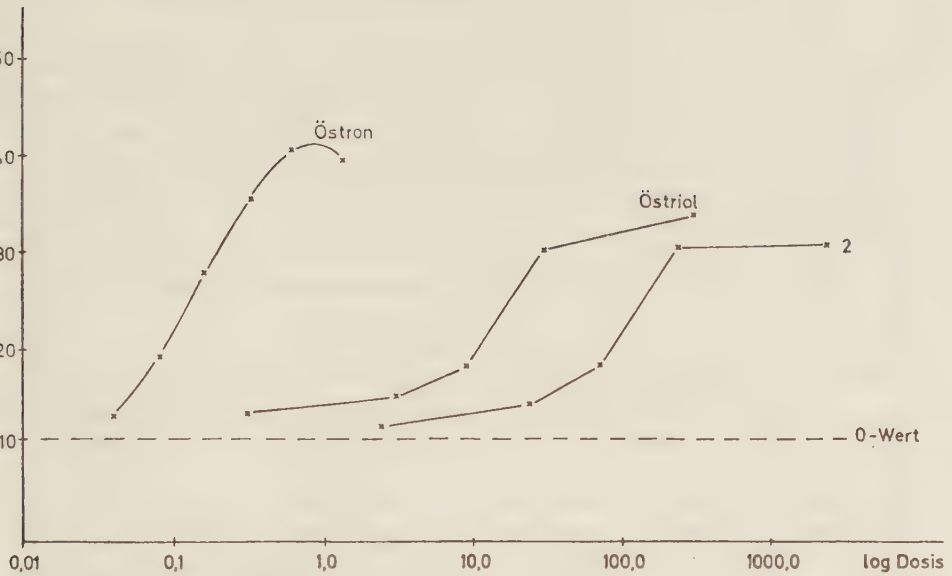


Abb. 15: Wirkung von 3,4-Di-(3'-hydroxyphenyl)-hexan (Verb.Nr. 2),
Östron und Östriol auf das Uteruswachstum der juvenilen Maus.

Abszisse: Dosis (µg) pro Tier und Versuch

Ordinate: $\frac{\text{Uterustrockengewicht (mg)}}{\text{Körpergewicht (g)}} \times 100$

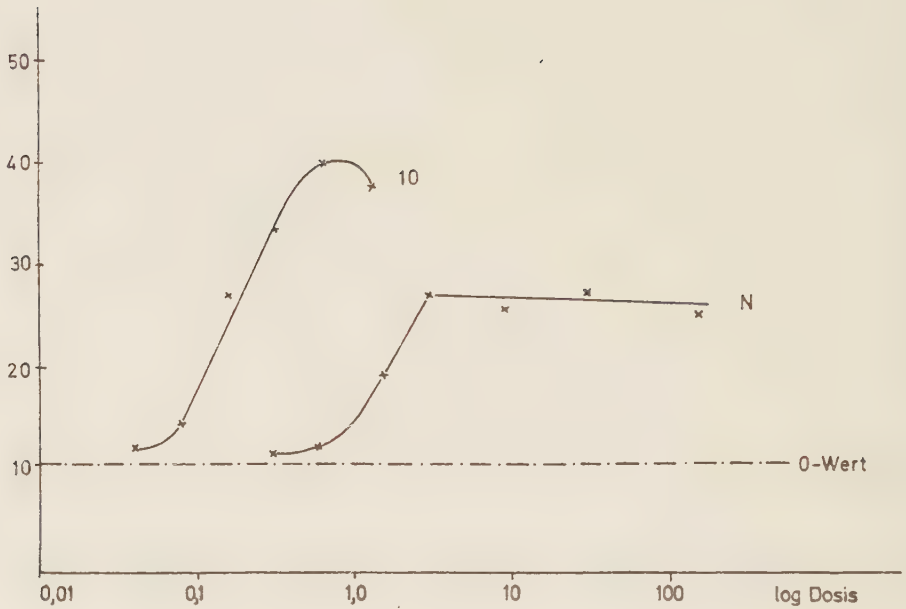


Abb. 16: Wirkung von Nafoxidin (N) auf das Uteruswachstum der juvenilen Maus im Vergleich zu 4,4'-Dihydroxy- α,β -diäthylstilben (Verb.Nr. 10).

Abszisse: Dosis (μg) pro Tier und Versuch

Ordinate: $\frac{\text{Uterustrockengewicht (mg)}}{\text{Körpergewicht (g)}} \times 100$

2.2.1.3. Bestimmung der antiöstrogenen Eigenschaften der stellungsisomeren Diäthylstilböstrole und Hexöstrole

Die Prüfung erfolgte mit Hilfe des Dorfman-Tests. Wirkungsparameter war der mit Östron stimulierte Uterus juveniler Mäuse, dessen Wachstum mit steigenden Dosen der rezeptoraffinen isomeren Diäthylstilböstrole und Hexöstrole und mit Nafoxidin zu hemmen versucht wurde. Zur Methodik des Verfahrens siehe experimenteller Teil 3.3.

Als Antiöstrogene erwiesen sich 3,3'-HES und 3,3'-DES (s. Tab. 14, 15).

Terenius (37) fand für Nafoxidin eine 45 %ige Hemmung des Uteruswachstums, die im Bereich des hier gefundenen Wertes liegt (s. Tab. 16).

2,2'-DES und 2,2'-HES wurden in einem großen Dosisbereich geprüft. Sie zeigten keine Hemmeffekte, sondern stimulierten auf Grund ihrer östrogenen Eigenschaften in den hohen Dosen das mit Östron induzierte Uteruswachstum (s. Tab. 17, 18).

Tabelle 14: Hemmung des mit Östron stimulierten Uteruswachstums juveniler Mäuse durch 3,4-Di-(3'-hydroxyphenyl)-hexan (Verb.Nr. 2)
Mittelwerte und Standardabweichungen der Wirkungsparameter und der Körpergewichte bei subcutaner Applikation von 2.

Verb.Nr.	Dosis* µg	Tier- zahl	Körpergewicht g	Wirkung**	% Hemmung***
0	0	9	13,0 $\pm$ 1,5	11,2 $\pm$ 1,6	-
Östron	0,32	9	12,4 $\pm$ 1,0	31,8 $\pm$ 5,4	-
2	3	9	13,8 $\pm$ 0,8	29,5 $\pm$ 5,5	11,2 +
0	0	10	13,5 $\pm$ 1,4	12,5 $\pm$ 2,6	-
Östron	0,32	10	14,0 $\pm$ 0,8	35,7 $\pm$ 3,1	-
2	7,5	10	14,9 $\pm$ 0,9	29,5 $\pm$ 3,0	26,7 ++
	15	10	13,3 $\pm$ 0,8	23,5 $\pm$ 2,8	52,6 ++
0	0	12	14,0 $\pm$ 1,8	10,0 $\pm$ 0,9	-
Östron	0,32	12	14,4 $\pm$ 0,8	44,8 $\pm$ 6,8	-
2	75	12	14,8 $\pm$ 1,0	28,1 $\pm$ 0,8	48,0 ++
	150	12	13,5 $\pm$ 1,2	28,3 $\pm$ 1,5	47,4 ++
	1500	12	14,6 $\pm$ 1,5	30,9 $\pm$ 3,2	40,4 ++

*: Gesamtdosis pro Tier und Versuch

**:

$$\frac{\text{Uterustrockengewicht (mg)}}{\text{Körpergewicht (g)}} \times 100$$

***:

$$\% \text{ Hemmung} = 100 - \frac{(W_{S,T} - W_O)}{W_S - W_O} \times 100$$

W_S : Wirkung Östron-Standard

$W_{S,T}$: Wirkung des Standards bei gleichzeitiger Gabe der Testsubstanz

W_O : Wirkung des Lösungsmittels (0-Wert)

+: nicht signifikant ($p > 0,05$)

++: signifikant ($p < 0,01$)

Tabelle 15: Hemmung des mit Östron stimulierten Uteruswachstums juveniler Mäuse durch 3,3'-Dihydroxy- α , β -diäthylstilben (Verb.Nr. 9). Mittelwerte und Standardabweichungen der Wirkungsparameter und der Körpergewichte bei subcutaner Applikation von 9.

Verb.Nr.	Dosis μg *	Tier- zahl	Körpergewicht g	Wirkung**	% Hemmung***
0	0	12	14,0 $\pm$ 1,8	10,0 $\pm$ 0,9	-
Östron	0,32	12	14,4 $\pm$ 0,8	44,8 $\pm$ 6,8	-
9	7,5	12	14,0 $\pm$ 1,8	38,3 $\pm$ 6,0	18,7 +
	15	12	13,2 $\pm$ 0,9	28,1 $\pm$ 5,5	48,0 +
	75	12	14,3 $\pm$ 0,9	29,9 $\pm$ 4,1	42,8 +
0	0	10	13,1 $\pm$ 1,2	10,4 $\pm$ 1,5	-
Östron	0,32	10	12,4 $\pm$ 1,5	34,2 $\pm$ 4,9	-
9	150	10	11,9 $\pm$ 1,5	23,5 $\pm$ 3,9	45,0 +
	1500	10	13,0 $\pm$ 1,4	24,7 $\pm$ 4,1	40,0 +
	4500	10	11,9 $\pm$ 0,8	24,9 $\pm$ 3,1	39,1 +

*: Gesamtdosis pro Tier und Versuch

**: $\frac{\text{Uterustrockengewicht (mg)}}{\text{Körpergewicht (g)}} \times 100$

***: $\% \text{ Hemmung} = 100 - \frac{(W_{S,T} - W_O)}{W_S - W_O} \times 100$

W_S : Wirkung Östron-Standard

$W_{S,T}$: Wirkung des Standards bei gleichzeitiger Gabe der Testsubstanz

W_O : Wirkung des Lösungsmittels (0-Wert)

+: signifikant ($p < 0,01$)

Tabelle 16: Hemmung des mit Östron stimulierten Uteruswachstums juveniler Mäuse durch Nafoxidin (N).
Mittelwerte und Standardabweichungen der Wirkungsparameter und der Körpergewichte bei subcutaner Applikation von N.

Verb.Nr.	Dosis µg *	Tier- zahl	Körpergewicht g	Wirkung**	% Hemmung***
0	0	10	13,6 $\pm$ 1,2	11,2 $\pm$ 1,4	-
Östron	0,32	10	13,4 $\pm$ 1,5	36,3 $\pm$ 6,0	-
N	0,9	10	14,3 $\pm$ 1,1	37,8 $\pm$ 3,1	29,9 + 38,2 + 41,8 +
	9,0	10	13,9 $\pm$ 1,1	28,8 $\pm$ 2,5	
	90	10	12,3 $\pm$ 1,9	26,7 $\pm$ 3,0	
	180	10	13,2 $\pm$ 1,6	25,8 $\pm$ 1,2	

*: Gesamtdosis pro Tier und Versuch

**: $\frac{\text{Uterustrockengewicht (mg)}}{\text{Körpergewicht (g)}} \times 100$

***: $\% \text{ Hemmung} = 100 - \frac{(W_{S,T} - W_o)}{W_S - W_o} \times 100$

W_S : Wirkung Östron-Standard

$W_{S,T}$: Wirkung des Standards bei gleichzeitiger Gabe der Testsubstanz

W_o : Wirkung des Lösungsmittels (0-Wert)

+: signifikant ($p < 0,01$)

Tabelle 17: Ergebnisse der Hemmversuche am Östron-stimulierten Uterus juveniler Mäuse mit 3,4-Di-(2'-hydroxyphenyl)-hexan (Verb.Nr. 1).
Mittelwerte und Standardabweichungen der Wirkungsparameter und der Körpergewichte bei subcutaner Gabe von 1.

Verb.Nr.	Dosis µg *	Tier- zahl	Körpergewicht g	Wirkung**
0	0	8	14,0 $\pm$ 1,0	10,8 $\pm$ 1,0
Östron	0,32	8	14,4 $\pm$ 2,0	30,8 $\pm$ 2,4
1	15	8	13,9 $\pm$ 0,9	32,4 $\pm$ 3,9
	150	8	13,9 $\pm$ 1,8	36,4 $\pm$ 4,2
	1500	8	12,8 $\pm$ 1,7	35,8 $\pm$ 3,2

Tabelle 18: Ergebnisse der Hemmversuche am Östron-stimulierten Uterus juveniler Mäuse mit 2,2'-Dihydroxy- α,β -diäthylstilben (Verb.Nr. 8).
Mittelwerte und Standardabweichungen der Wirkungsparameter und der Körpergewichte bei subcutaner Gabe von 8.

Verb.Nr.	Dosis µg *	Tier- zahl	Körpergewicht g	Wirkung**
0	0	12	14,0 $\pm$ 1,8	10,0 $\pm$ 0,9
Östron	0,32	12	14,4 $\pm$ 0,8	44,8 $\pm$ 6,8
8	15	12	13,2 $\pm$ 0,9	46,2 $\pm$ 4,9
	150	12	13,8 $\pm$ 1,8	48,9 $\pm$ 6,1
	1500	12	13,1 $\pm$ 1,1	49,0 $\pm$ 3,9

*: Gesamtdosis pro Tier und Versuch

** : $\frac{\text{Uterustrockengewicht (mg)}}{\text{Körpergewicht (g)}} \times 100$

2.2.1.4. Bestimmung der Reversibilität der Rezeptorbindung der stellungsisomeren Diäthylstilböstrole und Hexöstrole in vitro

Um den Einfluß der Stellung der OH-Gruppe auf die Stabilität der Inhibitor-Rezeptor-Bindung bei stellungsisomeren Diäthylstilb-östrolen (Verb.Nr. 8 - 10), Hexöstrolen (Verb.Nr. 1 - 3) und Nafoxidin (N) zu prüfen, führten wir den Reversibilitätstest nach Rochefort und Capony (39) an Cytosolen aus Kalbsuterus durch.

Zur Methode der Bestimmung siehe experimenteller Teil 3.1.7.

Alle Testsubstanzen wurden in einer Konzentration von 2×10^{-6} M getestet.

Die Verlagerung der OH-Gruppe in die 3,3'-Position führte weder beim Stilböstrol (s. Abb. 17) noch beim Hexöstrol (s. Abb. 18) zu einer entscheidenden Abnahme der Stabilität der Inhibitor (I)-Rezeptor-Bindung, während die 2,2'-Verbindungen vollständig reversibel waren.

Der Grad der Reversibilität von Nafoxidin stimmt mit den Beobachtungen von Rochefort (39) überein (s. Abb. 17). Die 4,4'- und 3,3'-OH-Gruppen scheinen in der Lage zu sein, den Wirkstoff-Rezeptorkomplex über Wasserstoffbrücken zu stabilisieren, während die 2,2'-OH-Gruppen einen zu großen Abstand vom Akzeptor im Rezeptorareal besitzen. Die 2,2'-Substanzen werden somit wie das Nafoxidin, das keine freien OH-Gruppen besitzt, nur über hydrophobe Wechselbeziehungen an den Rezeptor gebunden.

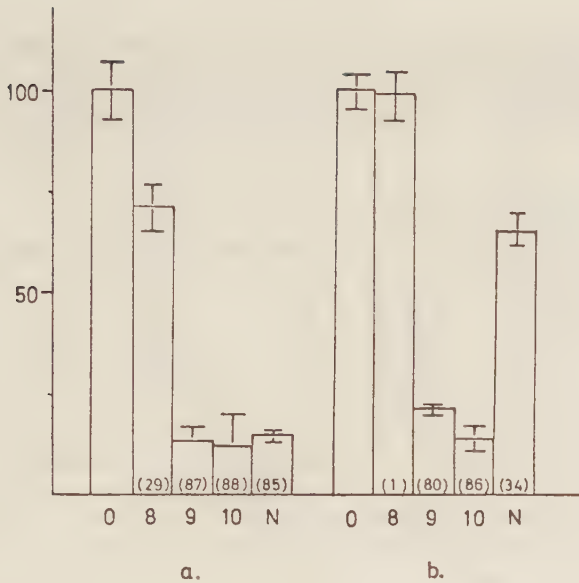


Abb. 17: Reversibilität der Rezeptor-Bindung der 2,2'-, 3,3'- bzw. 4,4'-Dihydroxy- α,β -diäthylstilbene (Verb.Nr. 8 - 10) und von Nafoxidin (N) nach Zugabe von ^3H -Östradiol;

Rezeptorquelle: Kalbsuterus; O: Kontrolle; $^3\text{H-E}_2$: ^3H -Östradiol; I: Inhibitor; I-Konzentration: $2 \times 10^{-6}\text{M}$; $^3\text{H-E}_2$ -Konzentration: $1 \times 10^{-9}\text{M}$; (): %-Anteil I-Rezeptor-Komplex;

a. α . I 60 min 0°C

β . $^3\text{H-E}_2$ 145 min 0°C

b. α . 60 min 0°C

β . Entfernung des ungeb. I

γ . $^3\text{H-E}_2$ 60 min 0°C , 25 min 25°C , 60 min 0°C

Abszisse: Nummern der Verbindungen

Ordinate: %-Anteil Östradiol-Rezeptor-Komplex

Die %-Angaben sind Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung aus 2 unabhängigen Versuchen mit je 3 Werten pro Hemmstoffkonzentration.

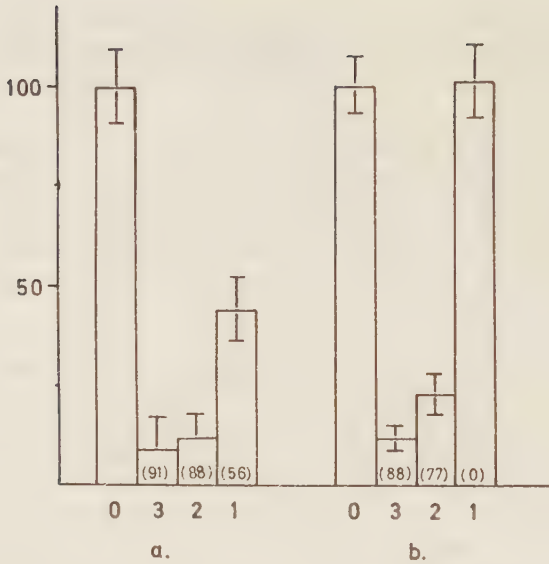


Abb. 18: Reversibilität der Rezeptor-Bindung von 3,4-Di-(2'-, 3'- bzw. 4'-hydroxyphenyl)-hexan (Verb.Nr. 1 - 3) nach Zugabe von ^3H -Östradiol;

Rezeptorquelle: Kalbsuterus; 0: Kontrolle; $^3\text{H-E}_2$: ^3H -Östradiol; I: Inhibitor; I-Konzentration; $2 \times 10^{-6} \text{ M}$; $^3\text{H-E}_2$ -Konzentration: $1 \times 10^{-9} \text{ M}$; (): %-Anteil I-Rezeptor-Komplex;

a. α . I 60 min 0°C

β . $^3\text{H-E}_2$ 145 min 0°C

b. α . I 60 min 0°C

β . Entfernung des ungeb. I

γ . $^3\text{H-E}_2$ 60 min 0°C , 25 min 25°C , 60 min 0°C ;

Abszisse: Nummern der Verbindungen

Ordinate: %-Anteil Östradiol-Rezeptor-Komplex

Die %-Angaben sind Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung aus zwei unabhängigen Versuchen mit je 3 Werten pro Hemmstoffkonzentration.

2.2.1.5. Hemmung des DMBA-induzierten hormonabhängigen
Mammapcarinoms der SD-Ratte durch 3,3'-Dihydroxy- α,β -
diäthylstilben (Verb.Nr. 9) und 3,4-Di-(3'-hydroxyphenyl)-
hexan (Verb.Nr. 2)

Die antiöstrogenen Verbindungen 3,3'-DES und 3,3'-HES wurden, entsprechend unserem Testsystem, einer eingehenden Prüfung am DMBA-induzierten Mammatumor der SD-Ratte unterzogen.

Als Kontrollsubstanz diente Nafoxidin, dessen tumorhemmende Eigenschaften bekannt sind (56).

Ausführliche Angaben zur Versuchsdurchführung und zur Datenerfassung siehe experimenteller Teil 3.6.

3,3'-DES (Tab. 19, Abb. 19) und 3,3'-HES (Tab. 21, Abb. 21) hemmen in einer Dosis von 2 mg/kg KG das hormonabhängige Mammapcarinom der SD-Ratte. Die Ergebnisse sind statistisch ($p < 0,01$ bzw. $< 0,05$) abgesichert.

Nafoxidin (Tab. 19, Abb. 19) in einer Dosis von 2 mg/kg KG und 3,3'-DES (Tab. 20, Abb. 20) in Dosen von 0,5 mg/kg bzw. 8 mg/kg KG führen dagegen nur zu einer Verzögerung des Tumorwachstums. Die Ergebnisse konnten statistisch nicht gesichert werden ($p > 0,05$).

Keine der getesteten Substanzen führte zu einer signifikanten Abnahme des Tiergewichts während der Versuche.

Tabelle 19: Hemmung des DMBA-induzierten Mammatumors der SD-Ratte durch 3,3'-Dihydroxy- α , β -diäthylstilben (Verb.Nr. 9) und Nafoxidin (N).

Applikation: Montag, Mittwoch, Freitag 2 mg/kg KG sc.
Therapiedauer: 21 Tage

Verb.Nr.	Tier- zahl	Tumor- zahl 100 %	Wirkung								% Tierge- wichtsän- derung***	% Tumor- flächen- änderung*	T/C
			VH		TH		KH		NT				
			Z	%	Z	%	Z	%	Z	%			
Kontr.	8	12	1	8	1	8	10	84	3	25		175	-
9	8	13	1	8	10	77	2	15	-	-		- 19 ⁺	0,28
N	8	10	1	10	6	60	3	30	-	-		100**	0,65

VH: völlige Tumorrückbildung
TH: teilweise Tumorrückbildung
KH: keine Hemmung des Tumorstadiums
NT: während der Therapie neu aufgetretene Tumoren
Z: Anzahl der beeinflussten bzw. nicht beeinflussten Tumoren
T/C: Tumorfläche der Therapietiere am 21. Versuchstag
Tumorfäche der Kontrolltiere am 21. Versuchstag
Mittelwert am 21. Versuchstag
*: signifikanter Unterschied zur Kontrolle ($p < 0,05$)
+: kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle ($p > 0,05$)
***: nach einer Woche Therapie

Tabelle 20: Hemmung des DMBA-induzierten Mammatumors der SD-Ratte durch 3,3'-Dihydroxy- α , β -diäthylstilben (Verb.Nr. 9).

Therapiedauer: 21 Tage; Applikation: Montag, Mittwoch, Freitag 0,5 bzw. 8 mg/kg KG sc.

Verb.Nr.	Tier- zahl	Tumor- zahl 100 %	Wirkung								% Tumor- flächen- änderung*	% Tierge- wichtsän- derung**	T/C
			VH		TH		KH		NT				
			Z	%	Z	%	Z	%	Z	%			
Kontr.	10	16	-	-	2	12	14	88	3	19		2	-
⁹ 0,5 mg/ kg	10	20	2	10	5	25	13	65	6	30	164 ⁺	2	0,6
⁹ 8 mg/ kg	10	19	2	11	4	21	13	68	2	11	229 ⁺	2	0,82

VH: völlige Tumorrückbildung

TH: teilweise Tumorrückbildung

KH: keine Hemmung des Tumorwachstums

NT: während der Therapie neu aufgetretene Tumoren

Z: Anzahl der beeinflussten bzw. nicht beeinflussten Tumoren

T/C: Tumoorfläche der Therapietiere am 21. Versuchstag

Tumoorfläche der Kontrolltiere am 21. Versuchstag

*: Mittelwert am 21. Versuchstag

+: kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle ($P > 0,05$)

**: nach einer Woche Therapie

Tabelle 21: Hemmung des DMBA-induzierten Mammatumors der SD-Ratte durch 3,4-Di-(3'-hydroxyphenyl)-hexan
(Verb.Nr. 2).

Therapiedauer: 28 Tage; Applikation: Montag, Mittwoch, Freitag 2 mg/kg KG sc.

Verb.Nr.	Tier- zahl	Tumor- zahl 100 %	Wirkung								% Tumor- flächen- änderung*	T/C
			Wirkung									
			VH		TH		KH		NT			
			Z	%	Z	%	Z	%	Z	%		
Kontr.	12	22	-	-	4	18	18	82	7	32	349	-
2	12	17	5	29	10	59	2	12	3	18	-12 ⁺	0,18

VH: völlige Tumorrückbildung
 TH: teilweise Tumorrückbildung
 KH: keine Hemmung des Tumorstadiums
 NT: während der Therapie neu aufgetretene Tumoren
 Z: Anzahl der beeinflussten bzw. nicht beeinflussten Tumoren
 T/C: Tumorfäche der Therapietiere am 28. Versuchstag
 Tumorfäche der Kontrolltiere am 28. Versuchstag
 *: Mittelwert am 28. Versuchstag
 **: nach einer Woche Therapie
 +: signifikanter Unterschied zur Kontrolle ($p < 0,01$)
 ***: kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle ($p > 0,05$)

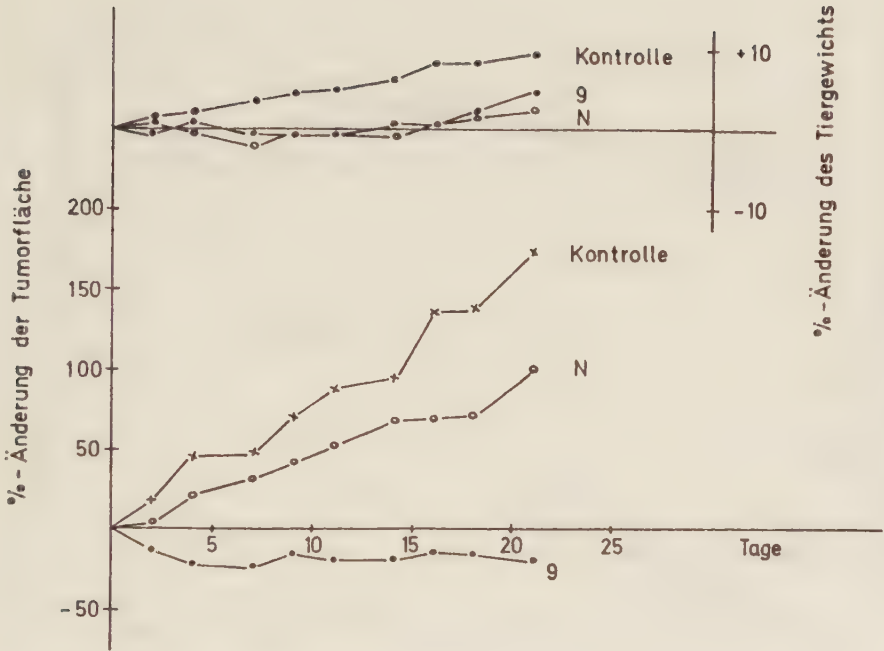


Abb. 19: DMBA-induzierter Mammatumor der SD-Ratte.

Beeinflussung der Tumorfläche und des Körpergewichts nach Behandlung mit 3,3'-Dihydroxy- α,β -diäthylstilben (Verb.Nr. 9) und Nafoxidin (N).

Therapiedauer: 21 Tage

Applikation: Montag, Mittwoch, Freitag je 3 x 2 mg/kg/Woche

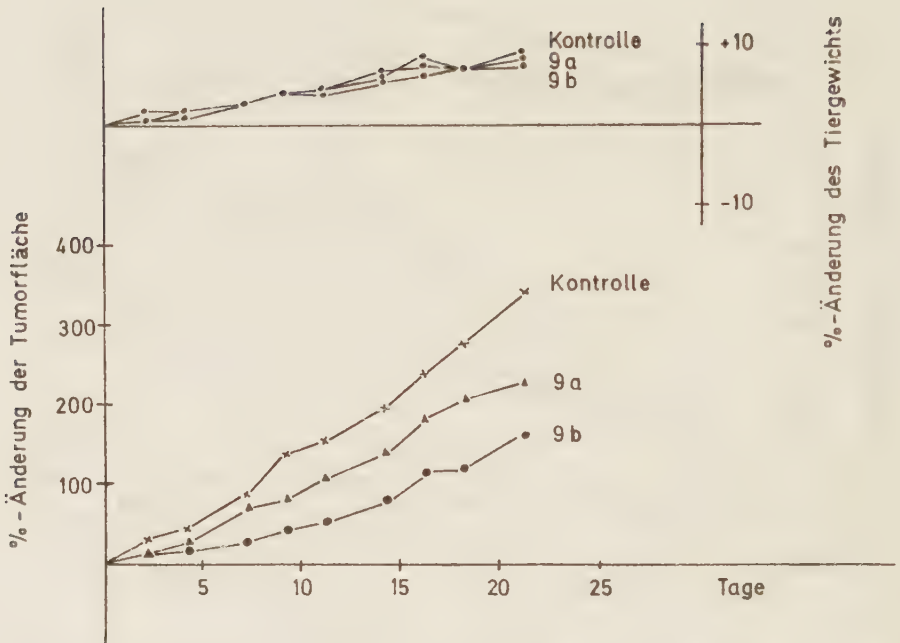


Abb. 20: DMBA-induzierter Mammatumor der SD-Ratte.

Beeinflussung der Tumorfläche und des Körpergewichts nach Behandlung mit 3,3'-Dihydroxy- α,β -diäthylstilben (Verb.Nr. 9).

9a: 3 x 8 mg/kgKG/Woche

9b: 3 x 0,5 mg/kgKG/Woche

Applikation: Montag, Mittwoch, Freitag

Therapiedauer: 21 Tage

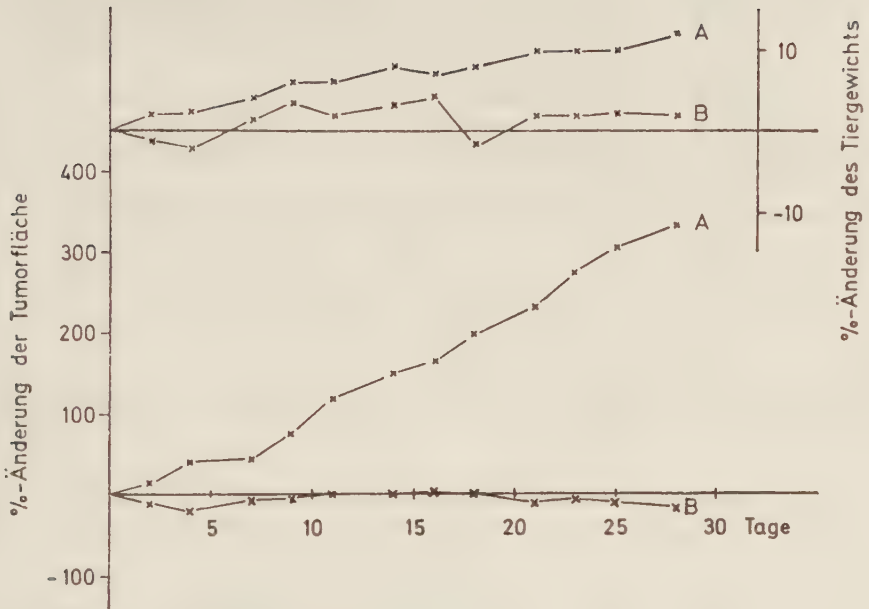


Abb. 21: DMBA-induzierter Mammatumor der SD-Ratte.

Beeinflussung der Tumorfläche und des Körpergewichts nach Behandlung mit 3,4-Di-(3'-hydroxyphenyl)-hexan (Verb.Nr. 2).

Dosierung: 3 x 2 mg/kg KG/Woche sc.

Therapiedauer: 28 Tage

A: Kontrolle

B: Verb.Nr. 2

2.2.1.6. Hemmung der DNA-, RNA- und Proteinsynthese des Walker-256-Carcinosarkoms durch die stellungsisomeren Diäthylstilböstrole, Hexöstrole und Nafoxidin; sowie Bestimmung deren cytocider Wirkung

Zur Methodik der Verfahren siehe experimenteller Teil 3.5.

Die Versuchsergebnisse zeigen, daß die Verlagerung der phenolischen OH-Gruppen von der 4,4'- in die 3,3'- bzw. 2,2'-Stellung keine Auswirkungen auf den Grad der DNA- und Proteinsynthesehemmung durch die stellungsisomeren Diäthylstilböstrole und Hexöstrole besitzt (s. Tab. 22, 23).

Die ED_{50} für die Hemmung der RNA-Synthese nimmt in der Reihenfolge $4,4' < 3,3' \leq 2,2'$ ab.

Die ED_{50} für die cytocide Wirkung variiert innerhalb der stellungsisomeren Diäthylstilböstrole und Hexöstrole nicht (s. Tab. 22, 23).

Die ED_{50} der DNA-, RNA- und Proteinsynthesehemmung sowie der cytociden Wirkung von Nafoxidin ist mit den Werten der Antiöstrogene 3,3'-HES und 3,3'-DES zu vergleichen (s. Tab. 24).

Tabelle 22: Hemmung der DNA-, RNA- und Proteinsynthese von Walker-256-Carcinomsarkomzellen in vitro durch 3,4-Di-(2'-, 3'- bzw. 4'-hydroxyphenyl)-hexan (Verb.Nr. 1-3).

Verb.Nr.	Konzentration Mol/l	% Hemmung *			cytocide Wirkung** ED ₅₀ (10 ⁻⁴ M)
		DNA	RNA	Protein	
1	5 × 10 ⁻⁶	10 ± 6,5	23 ± 6,3	-	2,7
	1 × 10 ⁻⁵	21 ± 3,5	44 ± 6,9	-	
	2,5 × 10 ⁻⁵	45 ± 3,2	63 ± 4,8	-	
	5,0 × 10 ⁻⁵	58 ± 7,7	84 ± 0,9	5 ± 4,0	
	7,5 × 10 ⁻⁵	77 ± 1,5	91 ± 1,2	28 ± 3,0	
	1,0 × 10 ⁻⁴	83 ± 1,8	94 ± 1,5	75 ± 2,7	
ED ₅₀ *** (10 ⁻⁵ M)		3,6 ± 0,2	1,3 ± 0,2	8,5 ± 1,1	
2	1,0 × 10 ⁻⁵	12 ± 6,3	39 ± 2,9	-	1,5
	2,5 × 10 ⁻⁵	30 ± 4,1	57 ± 3,0	-	
	5,0 × 10 ⁻⁵	48 ± 3,1	74 ± 1,9	-	
	7,5 × 10 ⁻⁵	57 ± 2,8	80 ± 1,2	-	
	1,0 × 10 ⁻⁴	66 ± 4,2	85 ± 1,4	20 ± 1,7	
ED ₅₀ *** (10 ⁻⁵ M)		5,5 ± 0,1	1,6 ± 0,2	-	
3	1,0 × 10 ⁻⁵	9 ± 6,0	16 ± 4,9	-	2,9
	2,5 × 10 ⁻⁵	28 ± 6,3	27 ± 4,3	-	
	5,0 × 10 ⁻⁵	51 ± 2,2	37 ± 1,4	-	
	7,5 × 10 ⁻⁵	61 ± 2,7	55 ± 2,9	-	
	1,0 × 10 ⁻⁴	70 ± 2,4	61 ± 2,8	27 ± 6,6	
ED ₅₀ *** (10 ⁻⁵ M)		5,1 ± 1,4	7,4 ± 0,2	-	

*: Mittelwerte ± Standardabweichung

**: Die Bestimmung der cytociden Wirkung erfolgte mit der Trypanblaufärbung (107), die Berechnung der ED₅₀ durch Interpolation im Wahrscheinlichkeitsnetz.

***: Berechnung der ED₅₀ ± Standardabweichung nach dem Probitverfahren (109)

Tabelle 23: Hemmung der DNA-, RNA- und Proteinsynthese von Walker-256-Carcinosarkomzellen in vitro durch 2,2'-, 3,3'- bzw. 4,4'-Dihydroxy- α,β -diäthylstilben (Verb.Nr. 8-10).

Verb.Nr.	Konzentration M	% Hemmung*			cytocide Wirkung** ED ₅₀ (10 ⁻⁴ M)
		DNA	RNA	Protein	
8	1 x 10 ⁻⁵	5 ± 4,2	37 ± 4,2	-	2,4
	2,5 x 10 ⁻⁵	20 ± 4,6	49 ± 4,4	12 ± 6,5	
	5,0 x 10 ⁻⁵	42 ± 4,8	80 ± 4,3	29 ± 7,3	
	7,5 x 10 ⁻⁵	50 ± 6,7	88 ± 2,1	42 ± 7,9	
	1,0 x 10 ⁻⁴	63 ± 5,0	93 ± 3,2	52 ± 4,8	
ED ₅₀ *** (10 ⁻⁵)		6,8 ± 0,1	1,9 ± 0,2	9,3 ± 1,5	
9	2,5 x 10 ⁻⁵	32 ± 5,8	46 ± 2,9	-	2,4
	5,0 x 10 ⁻⁵	46 ± 2,3	59 ± 2,0	15 ± 6,3	
	7,5 x 10 ⁻⁵	56 ± 2,4	70 ± 1,6	30 ± 4,2	
	1,0 x 10 ⁻⁴	63 ± 1,6	76 ± 7,7	42 ± 2,5	
ED ₅₀ *** (10 ⁻⁵)		5,8 ± 1,7	3,1 ± 1,9	12 ± 2,4	
10	2,5 x 10 ⁻⁵	2,0 ± 1,8	26 ± 3,7	5 ± 4,8	2,3
	5,0 x 10 ⁻⁵	18 ± 7,8	43 ± 3,4	18 ± 4,6	
	7,5 x 10 ⁻⁵	52 ± 6,0	51 ± 4,2	38 ± 2,8	
	1,0 x 10 ⁻⁴	67 ± 5,5	55 ± 1,6	52 ± 6,7	
ED ₅₀ *** (10 ⁻⁵)		7,7 ± 1,2	7,4 ± 1,7	9,7 ± 1,4	

*: Mittelwerte (N = 6) ± Standardabweichung

**: Die Bestimmung der cytociden Wirkung erfolgte mit der Trypanblaufärbung (107), die Berechnung der ED₅₀ durch Interpolation im Wahrscheinlichkeitsnetz.

***: Berechnung der ED₅₀ ± Standardabweichung nach dem Probitverfahren (109).

Tabelle 24: Hemmung der DNA-, RNA- und Proteinsynthese von Walker-256-Carcinomsarkomzellen in vitro durch Nafoxidin.

Konzentration (10^{-5} M)	* Hemmung *			Cytocide Wirkung** ED ₅₀ (10^{-4} M)
	DNA	RNA	Protein	
1	15 $\pm$ 6,1	12 $\pm$ 6,3	-	1,5
2,5	42 $\pm$ 2,6	36 $\pm$ 4,6	4,0 $\pm$ 3,5	
5,0	66 $\pm$ 3,4	57 $\pm$ 2,2	24 $\pm$ 1,2	
7,5	79 $\pm$ 4,3	73 $\pm$ 4,1	31 $\pm$ 6,6	
10,0	86 $\pm$ 2,2	83 $\pm$ 1,8	58 $\pm$ 5,8	
ED ₅₀ *** (10^{-5} M)	3,1 $\pm$ 0,1	3,8 $\pm$ 0,1	2,4 $\pm$ 0,1	

*: Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung

**: Die Bestimmung der cytociden Wirkung erfolgte mit der Trypanblaufärbung (107), die Berechnung der ED₅₀ durch Interpolation im Wahrscheinlichkeitsnetz.

***: Berechnung der ED₅₀ $\pm$ Standardabweichung nach dem Probitverfahren (109).

2.2.2. Entwicklung antiöstrogener Verbindungen aus Hexöstrol: N-isostere Hexöstrole vom Typ der N,N'-Dialkyl-1,2- diaryl-äthylendiamine

2.2.2.1. Bestimmung der Rezeptoraffinität, der Dissoziationskon- stanten K_i und der Reversibilität der Inhibitor- Rezeptor-Bindung

Die Verbindungen 21a, b - 69a, b und die bei deren Synthese anfallenden N-Alkyl-arylmethyl-amine (Verb.Nr. 21c - 69c) wurden in einer Endkonzentration von 2×10^{-5} M auf eine Affinität zum Östrogenrezeptor geprüft. Die ^3H -Östradiolkonzentration betrug 2×10^{-10} M. Einer Testung in höheren Konzentrationen stand die schlechte Löslichkeit der ADA im Wege. Die Inkubationszeit betrug 20 Stunden. Pro Konzentration wurden 3 Ansätze durchgeführt.

Als rezeptoraffin erwiesen sich die diastereomeren N,N'-Dialkyl-1,2-di-(2',6'-dichlorphenyl)-äthylendiamine (Verb.Nr. 62a, b - 64a, b) und racem-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(1'-naphthyl)-äthylendiamin (Verb.Nr. 67a).

Die Rezeptoraffinität von 67a war in der Konzentration von 2×10^{-5} M zu gering, um den Hemmtyp und die Dissoziationskonstante K_i bestimmen zu können.

Die Verbindungen 62a, b - 64a, b hemmen kompetitiv die Östradiol-Rezeptor-Wechselbeziehung (siehe Abb. 22 - 27).

Die K_i -Werte nehmen innerhalb der Homologen in der Reihenfolge Methyl > Aethyl > Propyl ab (siehe Tab. 25, 26).

Dem Test auf Reversibilität wurden die rezeptoraffinsten diastereomeren N,N'-Dipropyl-1,2-di-(2',6'-dichlorphenyl)-äthylendiamine (Verb.Nr. 64a, b) unterzogen (s. Abb. 28). Während sich das Racemat als reversibel erwies, zeigte sich die Rezeptor-Bindung der Mesoform als recht stabil.

Tabelle 25: In vitro Hemmung der Östradiol-Rezeptor-Wechselbeziehung durch racem-N,N'-Dialkyl-1,2-di-(2',6'-dichlorphenyl)-äthylendiamine (Verb.Nr. 62a, 63a und 64a): Dissoziationskonstanten der Hemmstoff-Rezeptorkomplexe (K_1) und des Östradiol-Rezeptorkomplexes (K_d):

Auswertung: nach Lineweaver-Burk;

Rezeptorquelle: Kalbsuterus;

Inkubationsdauer: 20 h bei 0°C

Verb.Nr.	62a	63a	64a
$K_1 \pm v^*$ M	$7,2 \pm 2,3 \times 10^{-6}$	$7,5 \pm 2,9 \times 10^{-6}$	$1,2 \pm 0,85 \times 10^{-6}$
$K_d \pm v^*$ M	$3,8 \pm 0,8 \times 10^{-10}$	$3,7 \pm 1,1 \times 10^{-10}$	$4,7 \pm 2,6 \times 10^{-10}$
Regressionsgerade o. Inhibitor**	$y = 0,42 x + 10,9$	$y = 0,95 x + 25,5$	$y = 0,44 x + 9,4$
Korrelationskoeff.	0,92	0,92	0,94
Anzahl d. Wertepaare	42	42	42
Regressionsgerade m. Inhibitor**	$y = 1,58 x + 10,5$	$y = 3,49 x + 25,8$	$y = 1,16 x + 8,9$
Korrelationskoeff.	0,96	0,92	0,995
Anzahl d. Wertepaare	36	36	36
Proteingehalt des Cytosols (mg/ml)	5,8	4,5	5,8
Rezeptorgehalt (fMol/mg Protein)	790	436	917

*: v = Vertrauensbereich ($\alpha = 0,05$)

** : $x = \frac{1}{\text{freies Östradiol}} \left(\frac{1}{M} \times 10^8 \right)$

$y = \frac{1}{\text{gebundenes Östradiol}} \left(\frac{1}{M} \times 10^8 \right)$

Tabelle 26: In vitro Hemmung der Östradiol-Rezeptor-Wechselbeziehung durch meso-N,N'-Dialkyl-1,2-di-(2',6'-dichlorphenyl)-äthylendiamine (Verb.Nr. 62b, 63b und 64b): Dissoziationskonstanten der Hemmstoff-Rezeptorkomplexe (K_i) und des Östradiol-Rezeptorkomplexes (K_d):

Auswertung: nach Lineweaver-Burk;

Rezeptorquelle: Kalbsuterus;

Inkubationszeit: 20 h bei 0°C.

Verb.Nr.	62b	63b	64b
$K_i \pm v^*$ M	$1,1 \pm 0,3 \times 10^{-5}$	$1,5 \pm 0,7 \times 10^{-6}$	$4,3 \pm 0,95 \times 10^{-7}$
$K_d \pm v^*$ M	$2,5 \pm 0,4 \times 10^{-10}$	$4,7 \pm 0,6 \times 10^{-10}$	$2,7 \pm 0,8 \times 10^{-10}$
Regressionsgerade o. Inhibitor**	$y = 0,51 x + 20,0$	$y = 0,41 x + 8,8$	$y = 0,38 x + 14,1$
Korrelationskoeff.	0,96	0,988	0,968
Anzahl d. Wertepaare	42	42	42
Regressionsgerade m. Inhibitor**	$y = 1,4 x + 19,6$	$y = 0,96 x + 8,0$	$y = 2,13 x + 13,4$
Korrelationskoeff.	0,97	0,91	0,986
Anzahl d. Wertepaare	36	36	36
Proteingehalt des Cytosols (mg/ml)	4,5	5,8	4,5
Rezeptorgehalt (fMol/mg Protein)	555	979	788

*: V = Vertrauensbereich ($\alpha = 0,05$)

** : $x = \frac{1}{\text{freies Östradiol}} \left(\frac{1}{M} \times 10^8 \right)$

$y = \frac{1}{\text{gebundenes Östradiol}} \left(\frac{1}{M} \times 10^8 \right)$

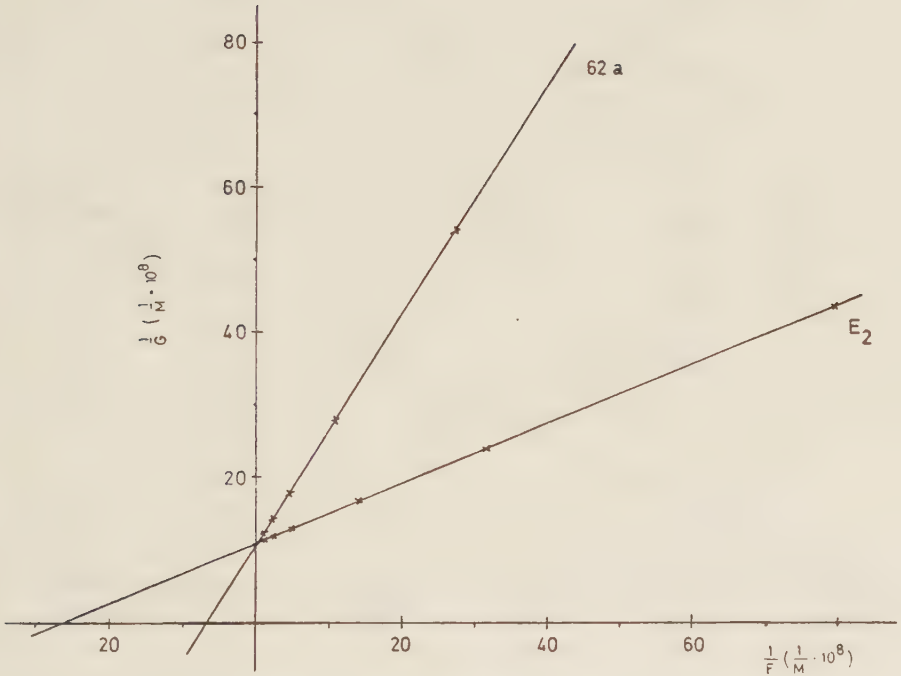


Abb. 22: Kompetitive Hemmung der Östradiol-Rezeptor-Wechselbeziehung durch racem-N,N'-Dimethyl-1,2-di-(2',6'-dichlorphenyl)-äthylendiamin (Verb.Nr. 62a)

Lineweaver-Burk-System;

Substrat: ^3H -Östradiol (E_2);

Rezeptorquelle: Kalbsuterus;

Inkubationsdauer: 20 h bei 0°C ;

Hemmstoffkonzentration: $2,0 \times 10^{-5}$ Mol/l

Abszisse: $\frac{1}{\text{freies } ^3\text{H-Östradiol}}$

Ordinate: $\frac{1}{\text{gebundenes } ^3\text{H-Östradiol}}$

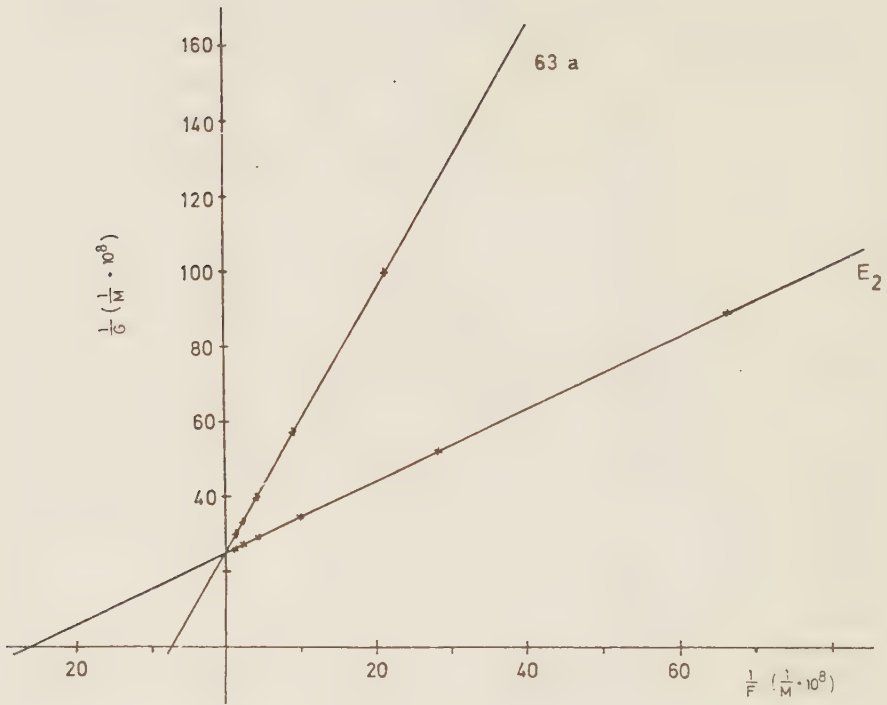


Abb. 23: Kompetitive Hemmung der Östradiol-Rezeptor-Wechselbeziehung durch racem-N,N'-Diäthyl-1,2-di-(2',6'-dichlorphenyl)-äthylendiamin (Verb.Nr. 63a)

Lineweaver-Burk-System;

Substrat: ^3H -Östradiol (E_2);

Rezeptorquelle: Kalbsuterus;

Inkubationsdauer: 20 h bei 0°C;

Hemmstoffkonzentration: $2,0 \times 10^{-5}$ Mol/l

Abszisse: $\frac{1}{\text{freies } ^3\text{H-Östradiol}}$

Ordinate: $\frac{1}{\text{gebundenes } ^3\text{H-Östradiol}}$

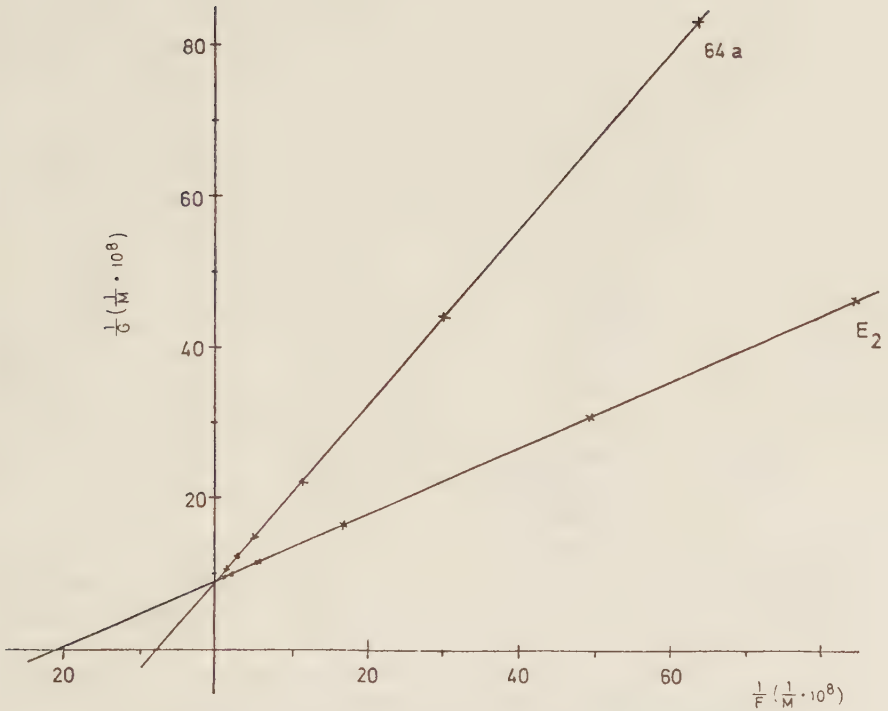


Abb. 24: Kompetitive Hemmung der Östradiol-Rezeptor-Wechselbeziehung durch racem-N,N'-Dipropyl-1,2-di-(2',6'-dichlorphenyl)-äthylendiamin (Verb.Nr. 64a)

Lineweaver-Burk-System;

Substrat: ^3H -Östradiol (E_2);

Rezeptorquelle: Kalbsuterus;

Inkubationsdauer: 20 h bei 0°C ;

Hemmstoffkonzentration: $2,0 \times 10^{-6}$ Mol/l

Abszisse: $\frac{1}{\text{freies } ^3\text{H-Östradiol}}$

Ordinate: $\frac{1}{\text{gebundenes } ^3\text{H-Östradiol}}$

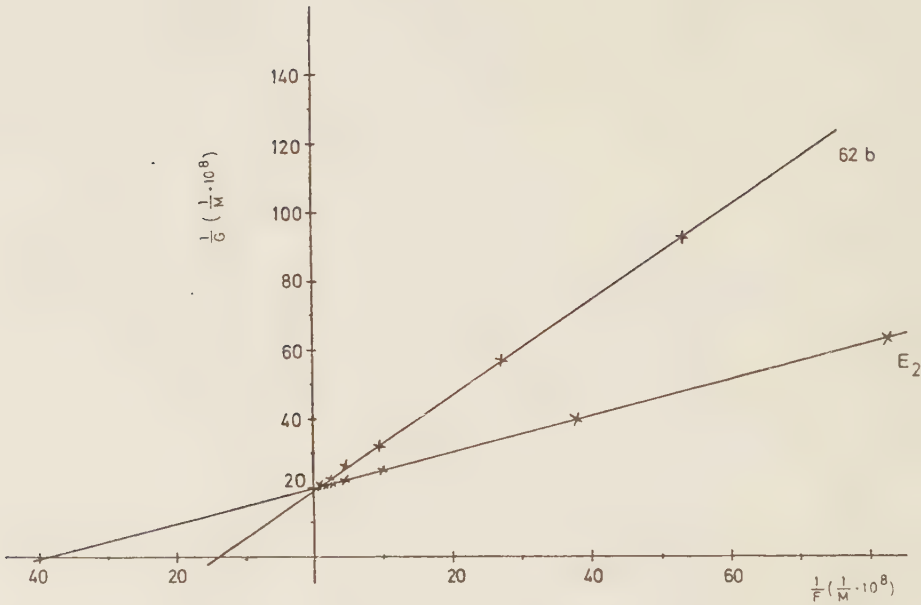


Abb. 25: Kompetitive Hemmung der Östradiol-Rezeptor-Wechselbeziehung durch meso-N,N'-Dimethyl-1,2-di-(2',6'-dichlorphenyl)-äthylendiamin (Verb.Nr. 62b)

Lineweaver-Burk-System;

Substrat: ^3H -Östradiol (E_2);

Rezeptorquelle: Kalbsuterus;

Inkubationsdauer: 20 h bei 0°C ;

Hemmstoffkonzentration: $2,0 \times 10^{-5}$ Mol/l

Abszisse: $\frac{1}{\text{freies } ^3\text{H-Östradiol}}$

Ordinate: $\frac{1}{\text{gebundenes } ^3\text{H-Östradiol}}$

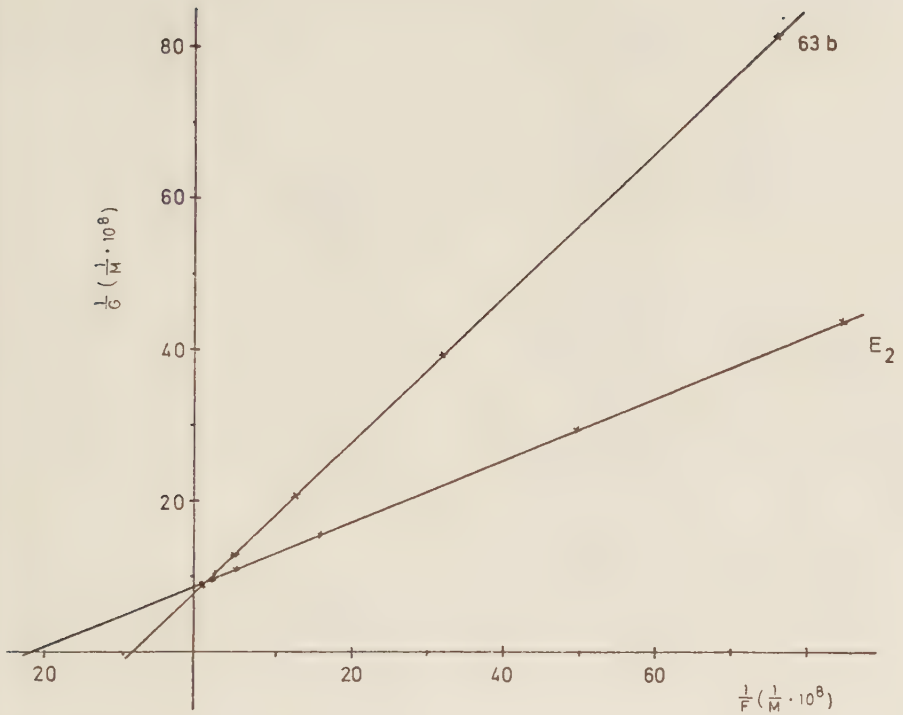


Abb. 26: Kompetitive Hemmung der Östradiol-Rezeptor-Wechselbeziehung durch meso-N,N'-Diäthyl-1,2-di-(2',6'-dichlorphenyl)-äthylendiamin (Verb.Nr. 63b)

Lineweaver-Burk-System;

Substrat: ^3H -Östradiol (E_2);

Rezeptorquelle: Kalbsuterus;

Inkubationsdauer: 20 h bei 0°C ;

Hemmstoffkonzentration: $2,0 \times 10^{-6}$ Mol/l

Abszisse: $\frac{1}{\text{freies } ^3\text{H-Östradiol}}$

Ordinate: $\frac{1}{\text{gebundenes } ^3\text{H-Östradiol}}$

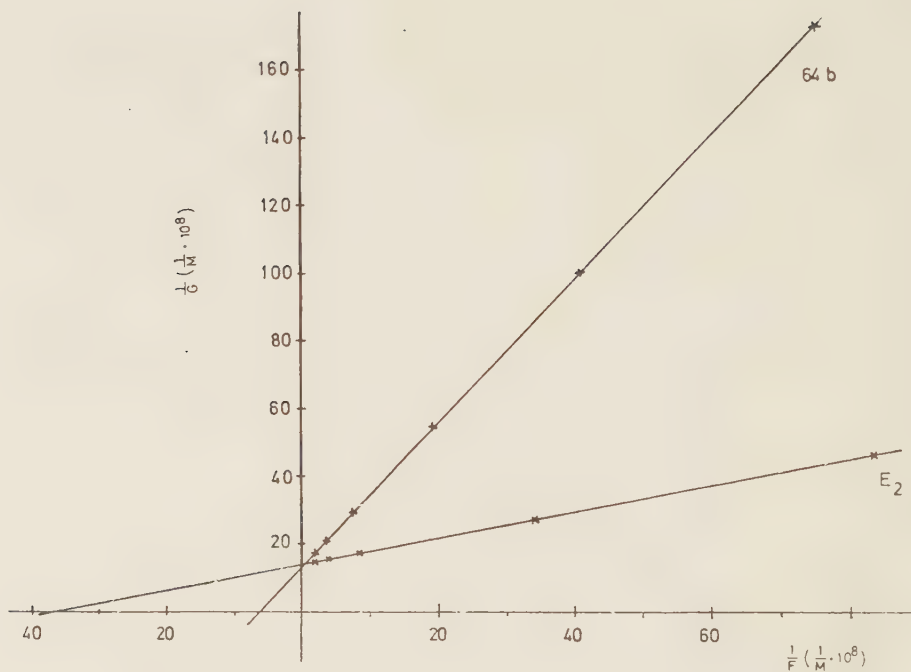


Abb. 27: Kompetitive Hemmung der Östradiol-Rezeptor-Wechselbeziehung durch meso-N,N'-Dipropyl-1,2-di-(2',6'-dichlorphenyl)-äthylendiamin (Verb.Nr. 64b)

Lineweaver-Burk-System;

Substrat: ^3H -Östradiol (E_2);

Rezeptorquelle: Kalbsuterus;

Inkubationsdauer: 20 h bei 0°C ;

Hemmstoffkonzentration: $2,0 \times 10^{-6}$ Mol/l

Abszisse: $\frac{1}{\text{freies } ^3\text{H-Östradiol}}$

Ordinate: $\frac{1}{\text{gebundenes } ^3\text{H-Östradiol}}$

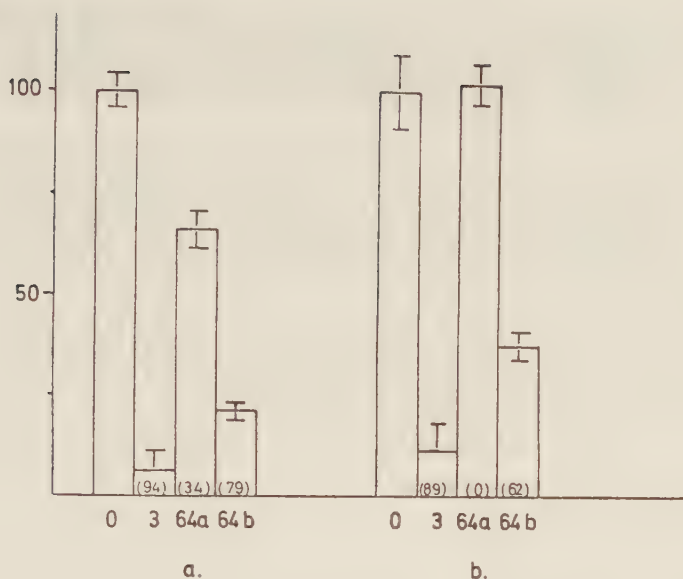


Abb. 28: Reversibilität der Rezeptor-Bindung der racem- bzw. meso-N,N'-Dipropyl-1,2-di-(2',6'-dichlorphenyl)-äthylendiamine (Verb.Nr. 64a bzw. 64b) und von 3,4-Di-(4'-hydroxyphenyl)-hexan (Verb.Nr. 3) nach Zugabe von ^3H -Östradiol;

Rezeptorquelle: Kalbsuterus; O: Kontrolle; $^3\text{H-E}_2$: ^3H -Östradiol;
 I: Inhibitor; I-Konzentration: 2×10^{-5} M; $^3\text{H-E}_2$ -Konzentration:
 1×10^{-9} M; (): %-Anteil I-Rezeptor-Komplex;

a. α . I 60 min 0°C

β . $^3\text{H-E}_2$ 145 min 0°C

b. α . I 60 min 0°C

β . Entfernung des ungeb. I

γ . $^3\text{H-E}_2$ 60 min 0°C, 25 min 25°C, 60 min 0°C

Abszisse: Nummern der Verbindungen

Ordinate: %-Anteil Östradiol-Rezeptor-Komplex

Die %-Angaben sind Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung aus 2 unabhängigen Versuchen mit je 3 Werten pro Hemmstoffkonzentration.

2.2.2.2. Bestimmung der uterotropen, kolpotropen und antiutero- tropen Eigenschaften der N,N'-Dialkyl-1,2-diaryl- äthylendiamine (Verb.Nr. 21a, b, c bis 69a, b, c)

Die rezeptoraffinen Substanzen dieser Verbindungsklasse (Verb.Nr. 62a, b - 64a, b; 67a) wurden mit dem Uterusgewichtstest (Dorfman-Test, juvenile Mäuse) und dem Vaginalabstrichtest (Allen-Doisy, ovariectomierte Mäuse) auf ihre Östrogenen Eigenschaften untersucht.

Die Substanzen wurden als Salze in Dosen von 1 mg, 3 mg, 6 mg, 9 mg, 18 mg pro Tier und Versuch intraperitoneal getestet. Pro Konzentration wurden 6 Tiere behandelt.

Die rezeptoraffinste Substanz (Verb.Nr. 64b) wurde als Salz und als Base intraperitoneal und subcutan in einer Konzentration von 18 mg appliziert.

Die Substanzen zeigten keine Östrogenen Eigenschaften. Sie stimulierten trotz ihrer in vitro-Affinität zum Östrogenrezeptor weder das Uteruswachstum der juvenilen Maus, noch zeigten sie am Scheidenepithel der ovariectomierten Tiere Effekte. Die relativ schlechte Reversibilität des 64b-Rezeptorkomplexes in vitro (s. Abb. 28) schließt - zumindest für diese Verbindung - eine zu kurze Verweildauer am Rezeptor als Ursache für die fehlende Östrogene Wirkung aus (36).

Die rezeptoraffinsten Substanzen dieser Verbindungsklasse (Verb.Nr. 62a, b - 64a, b; 67a) wurden auf einen eventuellen Östrogenantagonismus überprüft. Als Versuchsmodell diente der mit 0,1 μ g Östron stimulierte Uterus juveniler Mäuse. Die Testsubstanzen wurden in 6 Dosen in einem Konzentrationsbereich von 0,2 - 18 mg verabreicht. Pro Konzentration wurden 6 Tiere verwendet.

Die Substanzen waren nicht in der Lage, das durch Östron stimulierte Uteruswachstum juveniler Mäuse zu hemmen. Die untersuchten 1,2-Diphenyl-äthylendiamine besitzen trotz einer Affinität zum Östrogenrezeptor weder östrogene (agonistische) noch antiöstrogene (antagonistische) Eigenschaften.

2.2.2.3. Hemmung des DMBA-induzierten hormonabhängigen Mammacarcinoms der SD-Ratte durch meso-N,N'-Dipropyl-1,2-di-(2',6'-dichlorphenyl)-äthylendiamin (Verb.Nr. 64b)

Die Applikation von Verbindung 64b führte ab dem 12. Tag zu einem verzögerten Tumorwachstum (s. Abb. 29). Der Unterschied der prozentualen Tumorflächenänderung zwischen Kontrolle und Behandlungsgruppe am letzten Therapietag konnte statistisch nicht abgesichert werden (Tab. 27).

Die in vitro-Prüfung der Verbindungen Nr. 62a, b - 64a, b am hormonunabhängigen Walker-256-Carcinosarkom in einer Konzentration von 10^{-4} M ergab keine Hemmung der DNA-, RNA- bzw. Proteinsynthese.

Tabelle 27: Hemmung des DMBA-induzierten Mammatumors der SD-Ratte durch meso-N,N'-Dipropyl-1,2-di-(2',6'-dichlorphenyl)-äthylendiamin (Verb.Nr. 64b)

Applikation: Montag, Mittwoch, Freitag 60 mg/kg KG ip.
Therapiedauer: 28 Tage

Verb.Nr.	Tier- zahl	Tumor- zahl 100 %	Wirkung								% Tiergewichts- änderung**	% Tumorflä- chenänderung *	T/C
			VH		TH		KH		NT				
			Z	%	Z	%	Z	%	Z	%			
Kontr.	10	18	1	6	3	17	14	77	2	11	340	-	
64b	10	17	-	-	4	23	13	77	5	29	255 ⁺	0,73	

VH: völlige Tumorrückbildung

TH: teilweise Tumorrückbildung

KH: keine Hemmung des Tumorwachstums

NT: während der Therapie neu aufgetretene Tumoren

Z: Anzahl der beeinflussen bzw. nicht beeinflussen Tumoren

T/C: Tumorfläche der Therapietiere am 28. Versuchstag
Tumorfläche der Kontrolltiere am 28. Versuchstag

*: Mittelwert am 28. Versuchstag

+: kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle ($p > 0,05$)

**: nach einer Woche Therapie

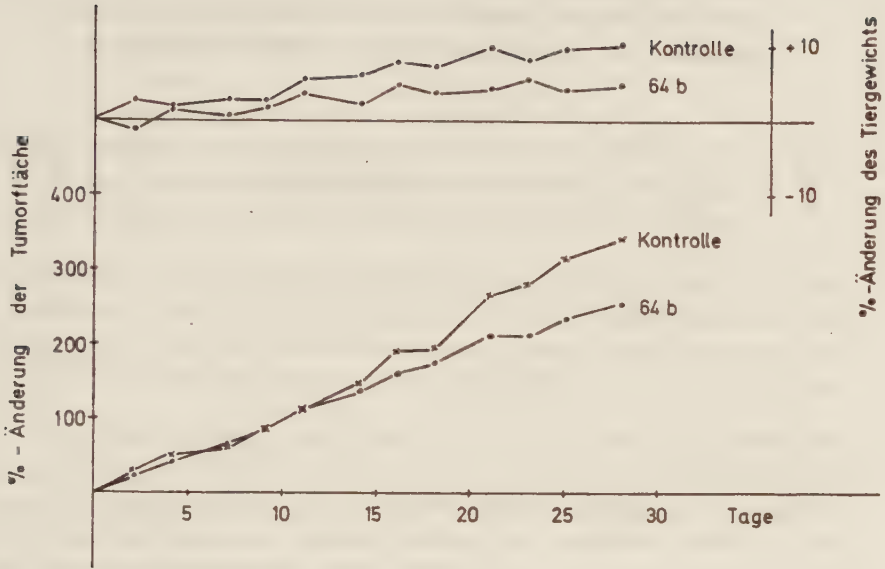


Abb. 29: DMBA-induzierter Mammatumor der SD-Ratte.

Beeinflussung der Tumorfläche und des Körpergewichts nach Behandlung mit meso-N,N'-Dipropyl-1,2-di-(2',6'-dichlorphenyl)-äthylendiamin (Verb.Nr. 64b).

Dosierung: 3 x 60 mg/kg KG/Woche ip.

Therapiedauer: 28 Tage

2.2.3. Versuche zur Entwicklung Östrogenrezeptor-affiner Cytostatica: 3,4-Di-(3'-aminomethyl-4'-hydroxyphenyl)-hexane, 3- bzw. 3,3'-Di-(aminomethyl)-4,4'-dihydroxy- α,β -diäthylstilbene und 4,4'-Dicarbamoyl- α,β -diäthylstilbene

2.2.3.1. Bestimmung der Dissoziationskonstanten K_i und der Reversibilität der Inhibitor-Rezeptor-Bindung von 3,4-Di-(3'-aminomethyl-4'-hydroxyphenyl)-hexanen (Verb.Nr. 4-7)

Die in 3'-Stellung durch Dimethylaminomethyl- und Diäthylaminomethylgruppen substituierten Verbindungen Nr. 4 und 5 besitzen eine Affinität zum Östrogenrezeptor (s. Tab. 28) und hemmen kompetitiv die Östradiol-Rezeptor-Wechselbeziehung (Abb. 30, 31).

Die Hemmwirkung der Pyrrolidino- und Piperidinomethylderivate des 4,4'-HES (Verb.Nr. 6,7) war in Konzentrationen von 2×10^{-5} M zu gering, um die Dissoziationskonstanten K_i und den Hemmtyp bestimmen zu können. Arbeiten in höheren Konzentrationsbereichen waren aufgrund der schlechten Löslichkeit der Substanzen nicht möglich.

Wegen der hohen Rezeptoraffinität der Synthesearbeitsverbindung Hexöstrol und der damit verbundenen Gefahr falscher Ergebnisse aufgrund von Verunreinigungen wurden die Verbindungen Nr. 4-7 mit Hilfe der präparativen Dünnschichtchromatographie gereinigt. Der Reversibilitätstest wurde mit der rezeptoraffinsten Verb.Nr. 4 vergleichend mit Hexöstrol durchgeführt (s. Abb. 32).

Tabelle 28: In vitro-Hemmung der Östradiol-Rezeptor-Wechselbeziehung durch 3,4-Di-(3'-aminomethyl-4'-hydroxyphenyl)-hexane (Verb.Nr. 4 und 5): Dissoziationskonstanten der Hemmstoff-Rezeptorkomplexe (K_i) und des Östradiol-Rezeptorkomplexes (K_d);

Auswertung: nach Lineweaver-Burk;

Rezeptorquelle: Kalbsuterus;

Inkubationsdauer: 20 h bei 0°C

Verb.Nr.	4	5
$K_i \pm v^*$ M	$2,1 \pm 0,2 \times 10^{-6}$	$5,9 \pm 1,0 \times 10^{-6}$
$K_d \pm v^*$ M	$2,3 \pm 0,3 \times 10^{-10}$	$4,6 \pm 1,1 \times 10^{-10}$
Regressionsgerade o. Inhibitor**	$y = 0,43 x + 18,61$	$y = 1,00 x + 21,74$
Korrelationskoeff.	0,97	0,96
Anzahl d. Wertepaare	42	42
Regressionsgerade m. Inhibitor**	$y = 0,85 x + 18,5$	$y = 4,44 x + 17,72$
Korrelationskoeff.	0,99	0,99
Anzahl d. Wertepaare	36	36
Proteingehalt des Cytosols (mg/ml)	6,8	6,8
Rezeptorgehalt (fMol/mg Protein)	396	338

*: V = Vertrauensbereich ($\alpha = 0,05$)

** : $x = \frac{1}{\text{freies Östradiol}} \left(\frac{1}{M} \times 10^8 \right)$

$y = \frac{1}{\text{gebundenes Östradiol}} \left(\frac{1}{M} \times 10^8 \right)$

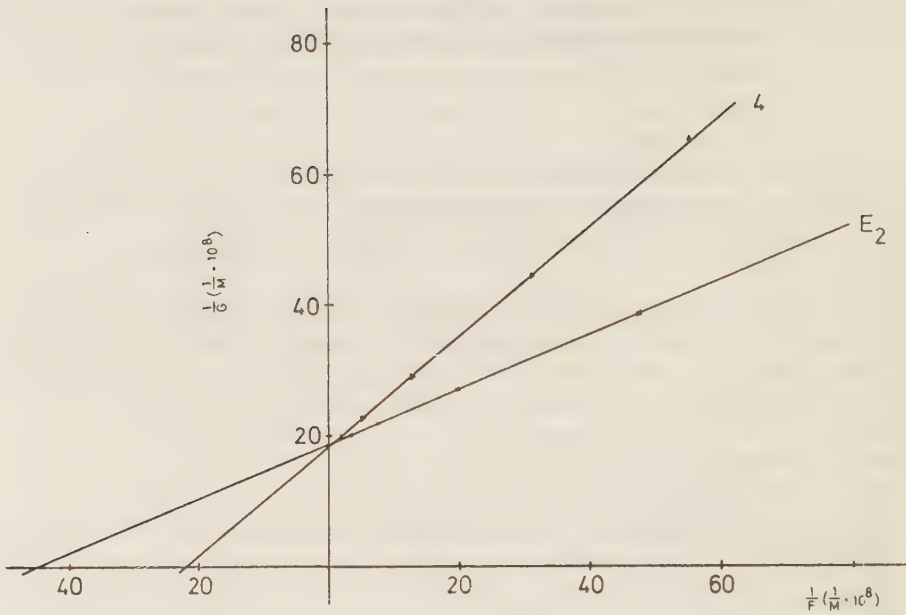


Abb. 30: Kompetitive Hemmung der Östradiol-Rezeptor-Wechselbeziehung durch 3,4-Di-(3'-dimethylaminomethyl-4'-hydroxyphenyl)-hexan (Verb.Nr. 4)

Lineweaver-Burk-System;

Substrat: ^3H -Östradiol (E_2);

Rezeptorquelle: Kalbsuterus;

Inkubationsdauer: 20 h bei 0°C ;

Hemmstoffkonzentration: $2,0 \times 10^{-6}$ Mol/l

Abszisse: $\frac{1}{\text{freies } ^3\text{H-Östradiol}}$

Ordinate: $\frac{1}{\text{gebundenes } ^3\text{H-Östradiol}}$

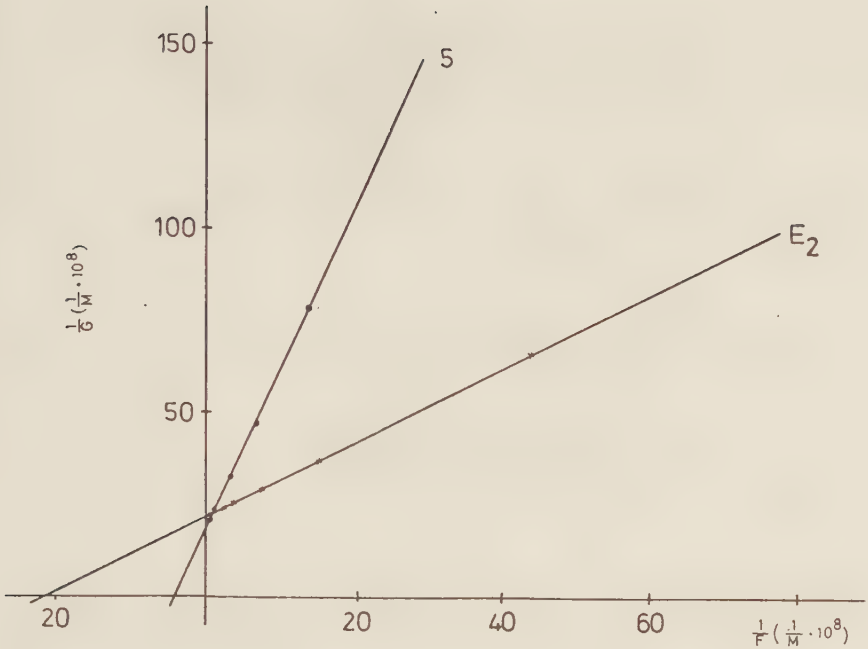


Abb. 31: Kompetitive Hemmung der Östradiol-Rezeptor-Wechselbeziehung durch 3,4-Di-(3'-diäthylaminomethyl-4'-hydroxyphenyl)-hexan (Verb.Nr. 5)

Lineweaver-Burk-System;

Substrat: ^3H -Östradiol (E_2);

Rezeptorquelle: Kalbsuterus;

Inkubationsdauer: 20 h bei 0°C ;

Hemmstoffkonzentration: $2,0 \times 10^{-5}$ Mol/l

Abszisse: $\frac{1}{\text{freies } ^3\text{H-Östradiol}}$

Ordinate: $\frac{1}{\text{gebundenes } ^3\text{H-Östradiol}}$

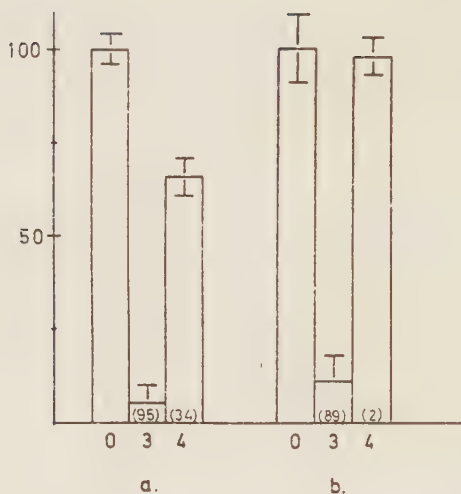


Abb. 32: Reversibilität der Rezeptor-Bindung von 3,4-Di-(3'-dimethylamino-methyl-4'-hydroxyphenyl)-hexan (Verb.Nr. 4) im Vergleich zu 3,4-Di-(4'-hydroxyphenyl)-hexan (Verb.Nr. 3) nach Zugabe von ^3H -Östradiol; Rezeptorquelle: Kalbsuterus; 0: Kontrolle; $^3\text{H-E}_2$: ^3H -Östradiol; I: Inhibitor; I-Konzentration: $2 \times 10^{-5} \text{ M}$; $^3\text{H-E}_2$ -Konzentration: $1 \times 10^{-9} \text{ M}$; (): %-Anteil I-Rezeptor-Komplex;

a. α . I 60 min 0°C

β . $^3\text{H-E}_2$ 145 min 0°C

b. α . I 60 min 0°C

β . Entfernung des ungeb. I

γ . $^3\text{H-E}_2$ 60 min 0°C , 25 min 25°C , 60 min 0°C

Abszisse: Nummern der Verbindungen

Ordinate: %-Anteil Östradiol-Rezeptor-Komplex

Die %-Angaben sind Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung aus 2 unabhängigen Versuchen mit je 3 Werten pro Hemmstoffkonzentration.

2.2.3.2. Bestimmung der Dissoziationskonstanten K_1 der 3- bzw. 3,3'-Di-(aminomethyl)-4,4'-dihydroxy- α,β -diäthylstilbene (Verb.Nr. 11-17) und der 4,4'-Dicarbamoyl- α,β -diäthylstilbene (Verb.Nr. 18-20)

Die 3,3'-Di-(aminomethyl)-4,4'-dihydroxy- α,β -diäthylstilbene (Verb.Nr. 14-17) zeigen bei 2×10^{-5} M keine Affinität zum Östrogenrezeptor.

Die monoaminomethylierten Verbindungen Nr. 11 und 12 hemmen kompetitiv die Östradiol-Rezeptor-Wechselbeziehung (s. Tab. 29; Abb. 33, 34).

Die Veresterung von 4,4'-DES mit Carbaminsäure (Verb.Nr. 18) bzw. Methylcarbaminsäure (Verb.Nr. 19) bringt keinen Verlust der Rezeptoraffinität des Moleküls. Beide Verbindungen hemmen kompetitiv die Östradiol-Rezeptor-Wechselbeziehung (s. Tab. 30; Abb. 35, 36). Nicht rezeptoraffin ist das mit N,N'-Bis-(β -chloräthyl)-carbaminsäure veresterte 4,4'-DES (Verb.Nr. 20). Diese Substanz wurde aufgrund der schlechten Wasserlöslichkeit als Kristallsuspension (10^{-3} M) getestet.

Die Verbindungen Nr. 11, 12, 18, 19, die durch Verunreinigung mit der hoch rezeptoraffinen Synthes Ausgangsverbindung 4,4'-DES falsche positive Ergebnisse liefern können, wurden mit Hilfe der präparativen Dünnschichtchromatographie gereinigt (s. experimenteller Teil 3.7.5.).

Die Ergebnisse zeigen, daß der Substitutionsgrad der 3,3'-ständigen Aminomethylgruppe (primär, tertiär, quartär) in den Verb.Nr. 13-17 keinen Einfluß auf ihre Rezeptoraffinität besitzt und bereits ein monosubstituierter Phenolrest in den Verb.Nr. 11 und 12 genügt, um eine Rezeptor-Wechselwirkung zu ermöglichen.

Tabelle 29: In vitro-Hemmung der Östradiol-Rezeptor-Wechselbeziehung durch 3-(Aminomethyl)-4,4'-dihydroxy- α , β -diäthylstilbene (Verb.Nr. 11 und 12): Dissoziationskonstanten der Hemmstoff-Rezeptorkomplexe (K_i) und des Östradiol-Rezeptorkomplexes (K_d);

Auswertung: nach Lineweaver-Burk;

Rezeptorquelle: Kalbsuterus;

Inkubationsdauer: 20 h bei 0°C.

Verb.Nr.	11	12
$K_i \pm V^* M$	$3,1 \pm 0,32 \times 10^{-8}$	$3,9 \pm 0,8 \times 10^{-7}$
$K_d \pm V^* M$	$5,0 \pm 0,4 \times 10^{-10}$	$3,2 \pm 1,3 \times 10^{-10}$
Regressionsgerade o. Inhibitor**	$y = 0,48 x + 9,63$	$y = 0,24 x + 7,53$
Korrelationskoeff.	0,998	0,982
Anzahl d. Wertepaare	42	42
Regressionsgerade m. Inhibitor**	$y = 3,53 x + 8,29$	$y = 1,22 x + 7,12$
Korrelationskoeff.	0,992	0,975
Anzahl d. Wertepaare	36	36
Proteingehalt des Cytosols (mg/ml)	4,8	4,5
Rezeptorgehalt (fMol/mg Protein)	1081	1475

*: V = Vertrauensbereich ($\alpha = 0,05$)

**:

$$x = \frac{1}{\text{freies Östradiol}} \left(\frac{1}{M} \times 10^8 \right)$$

$$y = \frac{1}{\text{gebundenes Östradiol}} \left(\frac{1}{M} \times 10^8 \right)$$

Tabelle 30: In vitro-Hemmung der Östradiol-Rezeptor-Wechselbeziehung durch 4,4'-Dicarbamoyl- α,β -diäthylstilben (Verb.Nr. 18 und 19): Dissoziationskonstanten der Hemmstoff-Rezeptorkomplexe (K_1) und des Östradiol-Rezeptorkomplexes (K_d);

Auswertung: nach Lineweaver-Burk;

Rezeptorquelle: Kalbsuterus;

Inkubationsdauer: 20 h bei 0°C.

Verb.Nr.	18	19
$K_1 \pm v^* \quad M$	$5,1 \pm 0,8 \times 10^{-9}$	$1,8 \pm 0,5 \times 10^{-7}$
$K_d \pm v^* \quad M$	$5,0 \pm 1,2 \times 10^{-10}$	$2,7 \pm 0,5 \times 10^{-10}$
Regressionsgerade o. Inhibitor**	$y = 0,33 x + 6,71$	$y = 0,26 x + 9,51$
Korrelationskoeff.	0,976	0,977
Anzahl d. Wertepaare	42	42
Regressionsgerade m. Inhibitor**	$y = 0,46 x + 7,2$	$y = 0,54 x + 10,1$
Korrelationskoeff.	0,981	0,965
Anzahl d. Wertepaare	36	36
Proteingehalt des Cytosols (mg/ml)	4,8	6,8
Rezeptorgehalt (fMol/mg Protein)	1552	773

*: v = Vertrauensbereich ($\alpha = 0,05$)

**: $x = \frac{1}{\text{freies Östradiol}} \left(\frac{1}{M} \times 10^8 \right)$

$y = \frac{1}{\text{gebundenes Östradiol}} \left(\frac{1}{M} \times 10^8 \right)$

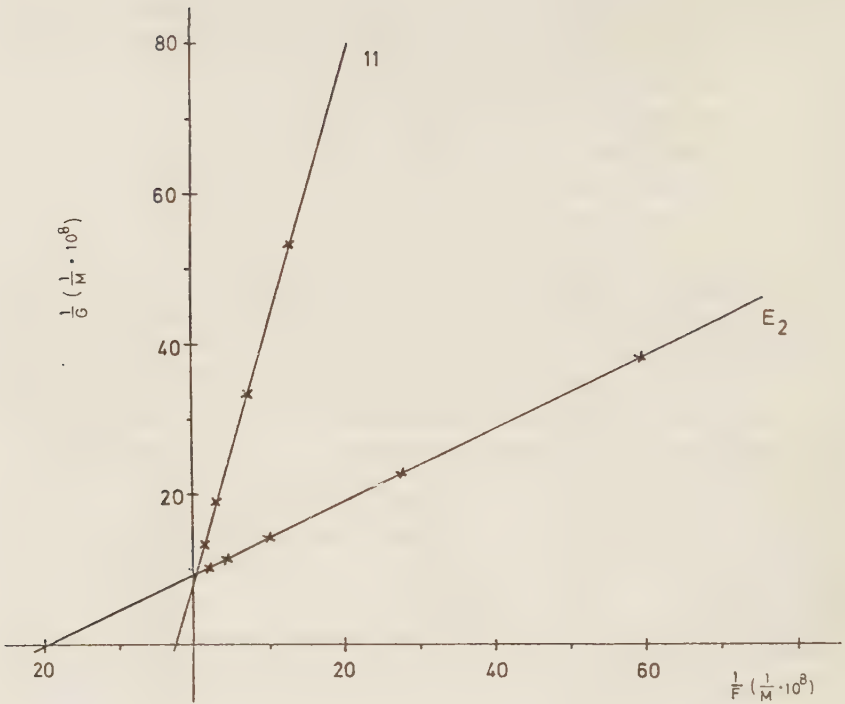


Abb. 33: Kompetitive Hemmung der Östradiol-Rezeptor-Wechselbeziehung durch 3-(Dimethylaminomethyl)-4,4'-dihydroxy- α,β -diäthylstilben (Verb.Nr. 11)

Lineweaver-Burk-System;

Substrat: ^3H -Östradiol (E_2);

Rezeptorquelle: Kalbsuterus;

Inkubationsdauer: 20 h bei 0°C ;

Hemmstoffkonzentration: $2,0 \times 10^{-7}$ Mol/l

Abszisse: $\frac{1}{\text{freies } ^3\text{H-Östradiol}}$

Ordinate: $\frac{1}{\text{gebundenes } ^3\text{H-Östradiol}}$

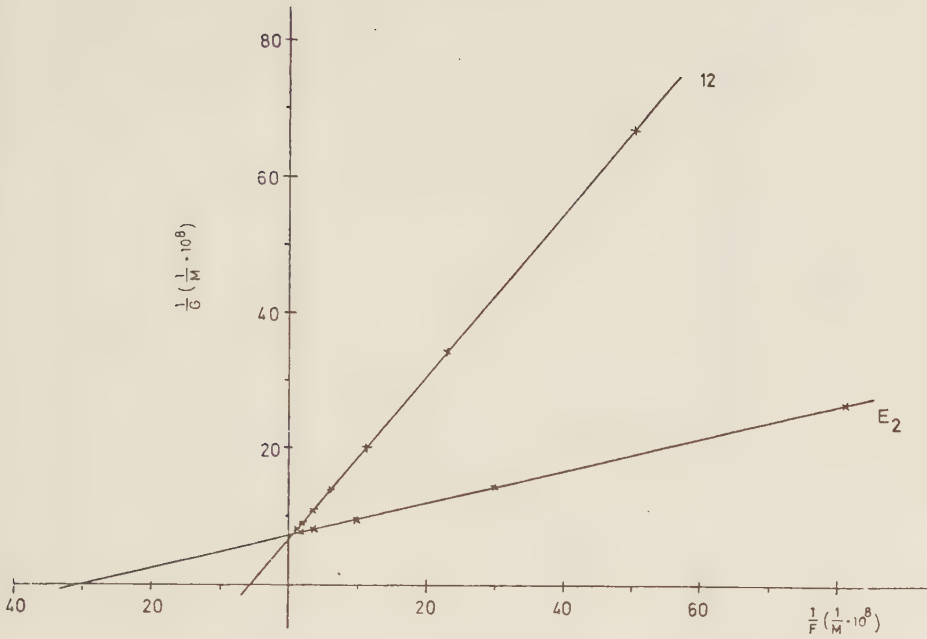


Abb. 34: Kompetitive Hemmung der Östradiol-Rezeptor-Wechselbeziehung durch 3-(α -Dimethylaminobenzyl)-4,4'-dihydroxy- α , β -diäthylstilben (Verb.Nr. 12).

Lineweaver-Burk-System;

Substrat: ^3H -Östradiol (E_2);

Rezeptorquelle: Kalbsuterus;

Inkubationsdauer: 20 h bei 0°C;

Hemmstoffkonzentration: $2,0 \times 10^{-6}$ Mol/l

Abszisse: $\frac{1}{\text{freies } ^3\text{H-Östradiol}}$

Ordinate: $\frac{1}{\text{gebundenes } ^3\text{H-Östradiol}}$

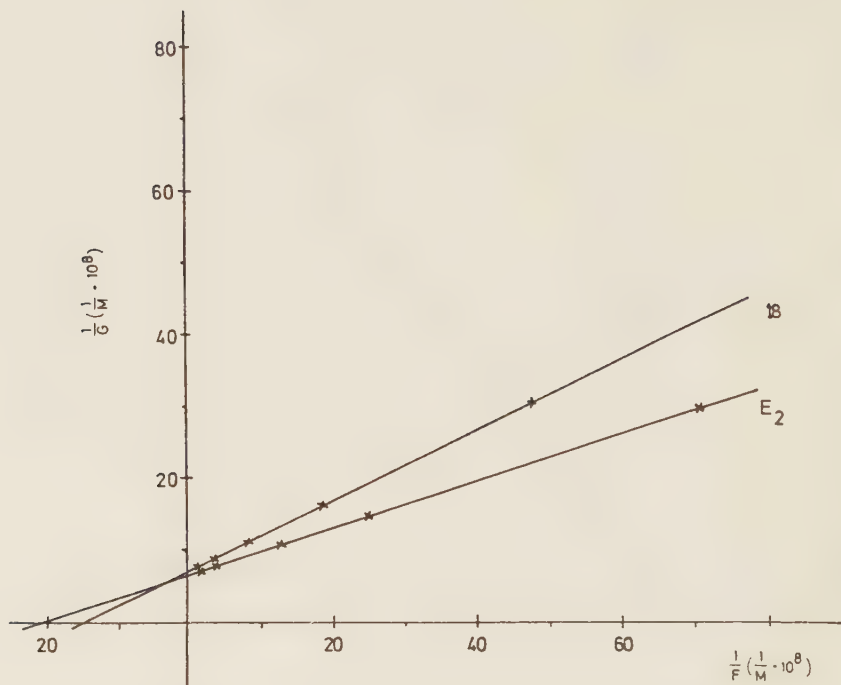


Abb. 35: Kompetitive Hemmung der Östradiol-Rezeptor-Wechselbeziehung durch 4,4'-Dicarbamoyl- α,β -diäthylstilben (Verb.Nr. 18).

Lineweaver-Burk-System;

Substrat: ^3H -Östradiol (E_2);

Rezeptorquelle: Kalbsuterus;

Inkubationsdauer: 20 h bei 0°C ;

Hemmstoffkonzentration: $2,0 \times 10^{-9}$ Mol/l

Abszisse: $\frac{1}{\text{freies } ^3\text{H-Östradiol}}$

Ordinate: $\frac{1}{\text{gebundenes } ^3\text{H-Östradiol}}$

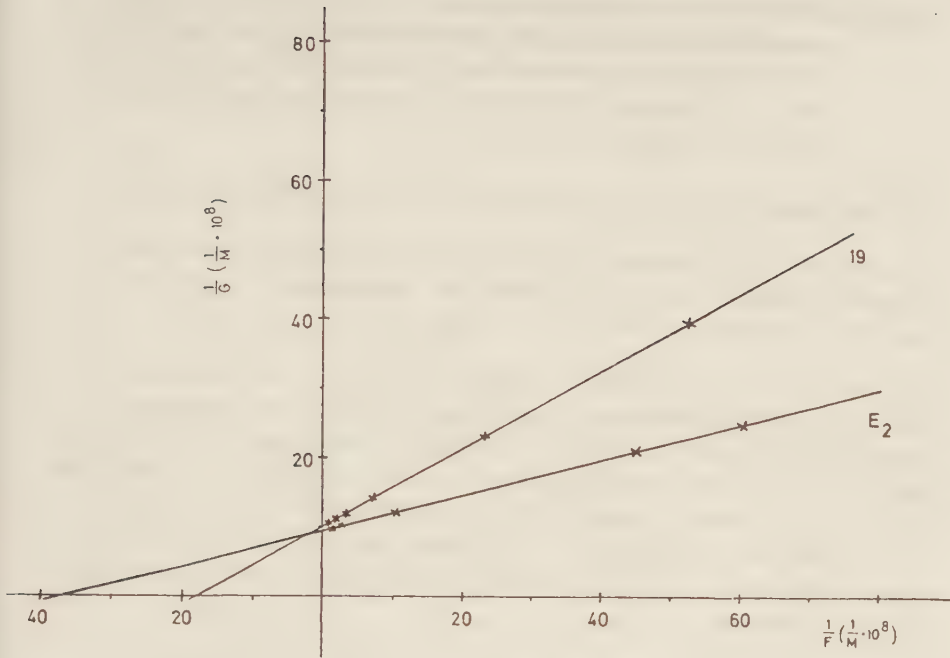


Abb. 36: Kompetitive Hemmung der Östradiol-Rezeptor-Wechselbeziehung durch 4,4'-Di-(methylcarbamoyl)- α,β -diäthylstilben (Verb.Nr. 19).

Lineweaver-Burk-System;

Substrat: ^3H -Östradiol (E_2);

Rezeptorquelle: Kalbsuterus;

Inkubationsdauer: 20 h bei 0°C ;

Hemmstoffkonzentration: $2,0 \times 10^{-7}$ Mol/l

Abszisse: $\frac{1}{\text{freies } ^3\text{H-Östradiol}}$

Ordinate: $\frac{1}{\text{gebundenes } ^3\text{H-Östradiol}}$

2.2.3.3. Bestimmung der uterotropen, kolpotropen und antiutero-
tropen Eigenschaften der rezeptoraffinen 3,4-Di-(3'-
aminomethyl-4'-hydroxyphenyl)-hexane (Verb.Nr. 4-7) und
der 3,3'-Di-(aminomethyl)-4,4'-dihydroxy- α,β -diäthyl-
stilbene (Verb.Nr. 14-16)

Die Substanzen wurden in aequimolaren Konzentrationen getestet.

Entsprechend der Rezeptoraffinität nimmt die östrogene Wirkung innerhalb dieser Verbindungsklasse mit zunehmender Größe des 3'-Aminomethylrestes ab (s. Tab. 32; Abb. 37).

Die Substanzen sind echte Östrogene, worauf die bei Verb.Nr. 4 und 5 im Uterusgewichtstest gemessenen mittleren Regressionen sowie die im Allen-Doisy-Test beobachtete Ausbildung eines vollen Östrus (s. Tab. 31) unter Applikation dieser Substanzen hinweisen. Aufgrund der akuten Toxizität der Verbindungen (4: 185 mg/kg; 5: 150 mg/kg; 6: 90 mg/kg; 7: 350 mg/kg) konnte der Verlauf der Dosis-Wirkungskurve nicht bis zum Maximum der östrogenen Wirkung verfolgt werden.

Im Antiöstrogentest nach Dorfman zeigten die rezeptoraffinen 3,4'-Di-(3'-aminomethyl-4'-hydroxyphenyl)-hexane keine Wirkung (s. Tab. 33).

Verb.Nr. 4 und 5 stimulierten aufgrund ihrer östrogenen Eigenwirkung in hohen Dosen das Uteruswachstum.

Die aminomethylierten Stilböstrole (Verb.Nr. 14-16) zeigten im getesteten Dosisbereich (0,1 - 3629 μg) weder uterotrope und kolpotrope, noch antiuterotrope Eigenschaften. Dieses Ergebnis deckt sich mit der fehlenden Rezeptoraffinität dieser Verbindungen.

Aufgrund fehlender antiöstrogener Eigenschaften wurde eine Prüfung der Testsubstanzen am DMBA-induzierten hormonabhängigen Mammatumors der SD-Ratte nicht durchgeführt; dagegen wurden weitere in vitro-Prüfungen auf cytostatische Wirkung am Walker-256-

Carcinosarkom vorgenommen. Durch Einbau von Aminomethylgruppen in 4,4'-DES und 4,4'-HES wurde eine Verstärkung der Antitumorwirkung angestrebt, die mit diesem Test nachgewiesen werden sollte.

Tabelle 31: Uterotroper und kolpotroper Test.

Mittelwerte und Standardabweichungen der Wirkungsparameter und der Körpergewichte juveniler Mäuse bei subcutaner Gabe von 3,4-Di-(3'-aminomethyl-4'-hydroxyphenyl)-hexanen (Verb.Nr. 4-7) im Vergleich zu 3,4-Di-(4'-hydroxyphenyl)-hexan (Verb.Nr. 3).

Verb.Nr.	Dosis* µg	Tier- zahl	Körpergewicht g	uterotrope Wirkung**	kolpotrope Wirkung***
0	0	7	13,3 ± 0,9	9,8 ± 0,7	0
3	<u>0,08</u>	7	13,1 ± 1,1	22,4 ± 2,2	y
	<u>0,16</u>	7	14,6 ± 2,0	31,6 ± 4,5	1
	<u>0,32</u>	7	13,1 ± 1,7	38,8 ± 5,2	1
4	<u>750</u>	7	13,0 ± 0,9	19,0 ± 4,0	x
	<u>1500</u>	7	12,6 ± 2,0	30,8 ± 3,5	1
	<u>3000</u>	7	12,7 ± 2,5	39,8 ± 4,4	1
5	<u>841</u>	7	13,6 ± 1,3	18,5 ± 1,9	x
	<u>1682</u>	7	12,7 ± 1,1	29,6 ± 3,1	1
	<u>3364</u>	7	13,3 ± 1,4	40,4 ± 4,7	1
6	835	7	12,8 ± 1,2	12,1 ± 1,6	0
	<u>1670</u>	7	11,9 ± 1,2	15,8 ± 3,1	x
	<u>3340</u>	7	10,9 ± 1,0	23,6 ± 1,9	y
7	881	7	11,7 ± 1,2	12,3 ± 2,2	0
	1762	7	13,5 ± 0,9	11,2 ± 1,3	0
	3525	7	12,6 ± 1,4	17,2 ± 3,8	x

*: Gesamtdosis pro Tier und Versuch; Dosis wurde zur Aktivitätsberechnung verwendet.

** : $\frac{\text{Uterustrockengewicht (mg)}}{\text{Körpergewicht (g)}} \times 100$

***: Klassifizierung siehe Methodik

Tabelle 32: Vergleich der uterotropen Aktivität von 3,4-Di-(3'-aminomethyl-4'-hydroxyphenyl)-hexanen (Verb. Nr. 4, 5 und 6) mit 3,4-Di-(4'-hydroxyphenyl)-hexan (Verb.Nr. 3) als Standard.
Zur Methodik der Aktivitätsberechnung siehe Cavalli-Sforza (103).

Verb.Nr.	relative Aktivität	Vertrauensbereich ($\alpha = 0,05$)	mittlere Regression	Präzision λ	Prüfung auf Parallelität F (P %)	Prüfung auf Linearität F (P %)
4	$1,0 \times 10^{-4}$	$0,84 - 1,2 \times 10^{-4}$	30,27	0,129	4,12 (> 5)	0,06 (> 5)
5	$0,87 \times 10^{-4}$	$0,83 - 0,92 \times 10^{-4}$	30,82	0,114	6,1 (> 1)	1,6 (> 5)
6	$0,25 \times 10^{-4}$	$0,21 - 0,29 \times 10^{-4}$	25,46	0,131	0,01 (> 5)	2,99 (> 5)

Tabelle 33: Ergebnisse der Hemmversuche am Östron-stimulierten Uterus juveniler Mäuse mit 3,4-Di-(3'-aminomethyl-4'-hydroxyphenyl)-hexanen (Verb.Nr. 4-7).

Verb.Nr.	Dosis* µg	Tier- zahl	Körpergewicht*** g	Wirkung**/**
0	0	7	14,0 $\pm$ 1,5	10,4 $\pm$ 1,3
Östron	0,32	7	14,9 $\pm$ 1,8	37,8 $\pm$ 4,6
4	75	7	13,9 $\pm$ 1,9	37,2 $\pm$ 3,8
	3000	7	14,5 $\pm$ 1,6	40,2 $\pm$ 4,8
5	84	7	14,2 $\pm$ 1,8	38,2 $\pm$ 4,9
	3364	7	14,5 $\pm$ 1,7	40,9 $\pm$ 3,6
6	83	7	13,9 $\pm$ 1,5	37,7 $\pm$ 3,9
	3340	7	12,1 $\pm$ 1,2	39,9 $\pm$ 2,6
7	88	7	14,5 $\pm$ 1,5	38,2 $\pm$ 4,1
	3525	7	13,8 $\pm$ 1,8	38,7 $\pm$ 3,2

*: Gesamtdosis pro Tier und Versuch

** : $\frac{\text{Uterustrockengewicht (mg)}}{\text{Körpergewicht (g)}} \times 100$

***: Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung

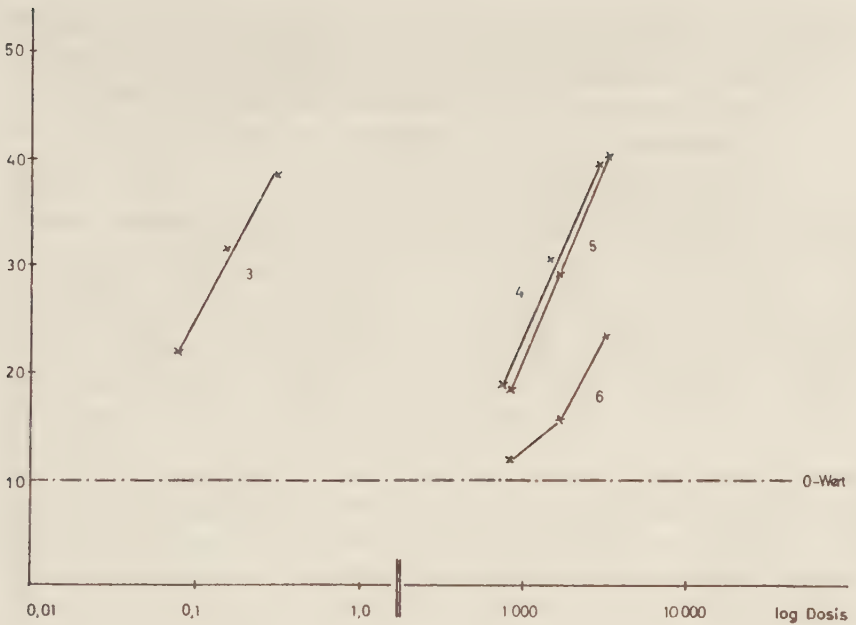


Abb. 37: Wirkung von 3,4-Di-(3'-aminomethyl-4'-hydroxyphenyl)-hexanen (Verb.Nr. 4, 5 und 6) auf das Uteruswachstum der juvenilen Maus im Vergleich zu 3,4-Di-(4'-hydroxyphenyl)-hexan (Verb.Nr. 3).

Abszisse: Dosis (μg) pro Tier und Versuch

Ordinate: $\frac{\text{Uterustrockengewicht (mg)}}{\text{Körpergewicht (g)}} \times 100$

2.2.3.4. Hemmung der DNA-, RNA- und Proteinsynthese von Walker-256-Carcinosarkomzellen in vitro durch 3,4-Di-(3'-aminomethyl-4'-hydroxyphenyl)-hexane (Verb.Nr. 4-7) und 3,3'-Di-(aminomethyl)-4,4'-dihydroxy- α , β -diäthylstilbene (Verb.Nr. 14-16).

Verb.Nr.	Konzentration M	% - Hemmung*		
		DNA	RNA	Protein
3	10^{-4}	72 $\pm$ 2,5	65 $\pm$ 3,4	30 $\pm$ 5,8
4	10^{-4}	53 $\pm$ 7,4	54 $\pm$ 5,1	0
5	10^{-4}	17 $\pm$ 6,4	36 $\pm$ 2,7	0
6	10^{-4}	52 $\pm$ 6,6	51 $\pm$ 2,7	17 $\pm$ 6,2
7	10^{-4}	10 $\pm$ 9,7	10 $\pm$ 7,2	0
10	10^{-4}	69 $\pm$ 3,8	58 $\pm$ 2,5	48 $\pm$ 1,8
14	10^{-4}	51 $\pm$ 4,2	47 $\pm$ 1,8	0
15	10^{-4}	48 $\pm$ 1,1	46 $\pm$ 3,8	6 $\pm$ 4,2
16	10^{-4}	22 $\pm$ 6,8	12 $\pm$ 2,8	0

*: Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung

Die in obenstehender Tabelle aufgeführten Ergebnisse zeigen, daß die Aminomethylierung des Diäthylstilböstrols (Verb.Nr. 10) und des Hexöstrols (Verb.Nr. 3) nicht zu Substanzen führt, die stärker cytostatisch wirken als die entsprechenden Ausgangsverbindungen.

2.2.4. Untersuchung zur Entwicklung von Verbindungen mit antiinflammatorischen und mammatumorrhemmenden Eigenschaften:
4,5-Di-(4'-hydroxyphenyl)-imidazole

2.2.4.1. Bestimmung der Dissoziationskonstanten K_i und der Reversibilität der Inhibitor-Rezeptor-Bindung von 4,5-Di-(4'-hydroxyphenyl)-imidazolen (Verb.Nr. 70-73)

2-Phenyl-4,5-di-(4'-hydroxyphenyl)-imidazol (Verb.Nr. 71) besitzt in der Reihe der getesteten Imidazole die größte Affinität zum Östrogenrezeptor. Der Methyläther der Substanz (Verb.Nr. 70) ist unwirksam.

Die Verbindungen Nr. 72 und 73 mit einem $-CH_3$ bzw. $-H$ in 2-Position zeigen im Vergleich zu Verb. Nr. 71 eine geringere Rezeptoraffinität (s. Tab. 34). Bei den Verb.Nr. 71-73 kommt es zu einer kompetitiven Hemmung der Östradiol-Rezeptor-Wechselbeziehung (s. Abb. 38).

Die Prüfung auf Reversibilität der Rezeptorbindung wurde mit der rezeptoraffinsten Verb.Nr. 71 durchgeführt. Nach Zugabe von 3H -Östradiol und nach kurzem Erwärmen des Inkubationsansatzes auf $25^\circ C$ zeigte sich der Imidazol-Rezeptorkomplex voll reversibel (s. Abb. 39).

Tabelle 34: In vitro-Hemmung der Östradiol-Rezeptor-Wechselbeziehung durch 2-substituierte 4,5-Di-(4'-hydroxyphenyl)-imidazole (Verb.Nr. 71, 72 und 73): Dissoziationskonstanten der Hemmstoff-Rezeptorkomplexe (K_i) und des Östradiol-Rezeptorkomplexes (K_d);

Auswertung: nach Lineweaver-Burk;

Rezeptorquelle: Kalbsuterus;

Inkubationsdauer: 20 h bei 0°C.

Verb.Nr.	72	73	71
$K_i \pm v^* \quad M$	$1,6 \pm 0,3 \times 10^{-5}$	$6,8 \pm 1,5 \times 10^{-6}$	$2,9 \pm 0,2 \times 10^{-6}$
$K_d \pm v^* \quad M$	$4,0 \pm 0,4 \times 10^{-10}$	$4,0 \pm 0,4 \times 10^{-10}$	$4,0 \pm 0,4 \times 10^{-10}$
Regressionsgerade o. Inhibitor**	$y = 0,53 x + 13,21$	$y = 0,53 x + 13,21$	$y = 0,53 x + 13,21$
Korrelationskoeff.	0,996	0,996	0,996
Anzahl d. Wertepaare	36	36	36
Regressionsgerade m. Inhibitor	$y = 1,21 x + 14,32$	$y = 2,11 x + 14,27$	$y = 4,20 x + 15,43$
Korrelationskoeff.	0,986	0,979	0,999
Anzahl d. Wertepaare	36	36	36
Proteingehalt des Cytosols (mg/ml)	5,0	5,0	5,0
Rezeptorgehalt (fMol/mg Protein)	757	757	757

*: V = Vertrauensbereich ($\alpha = 0,05$)

**:

$$x = \frac{1}{\text{freies Östradiol}} \left(\frac{1}{M} \times 10^8 \right)$$

$$y = \frac{1}{\text{gebundenes Östradiol}} \left(\frac{1}{M} \times 10^8 \right)$$

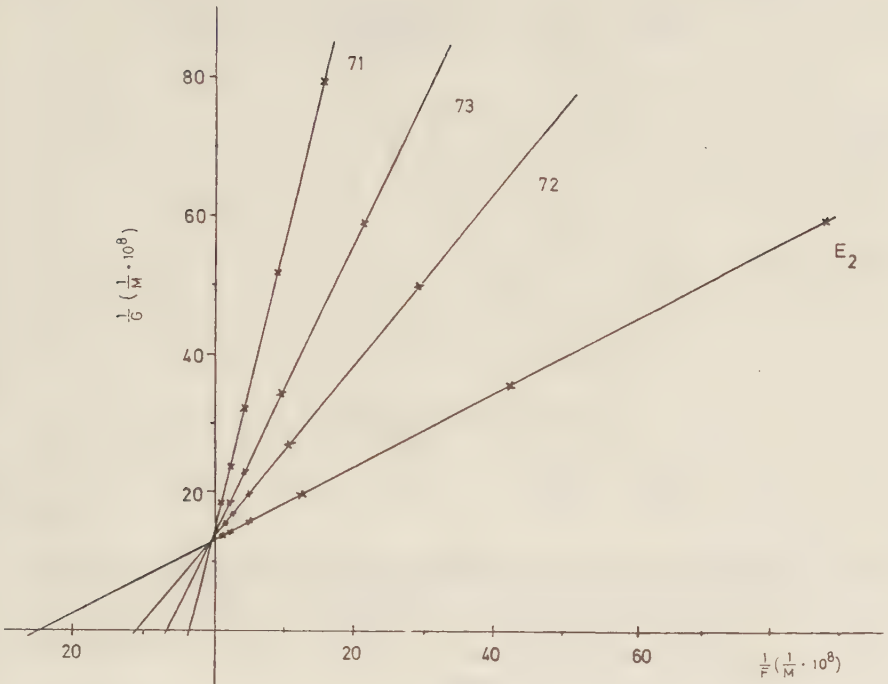


Abb. 38: Kompetitive Hemmung der Östradiol-Rezeptor-Wechselbeziehung durch 2-substituierte 4,5-Di-(4'-hydroxyphenyl)-imidazole (Verb.Nr. 71-73).

Lineweaver-Burk-System;

Substrat: ^3H -Östradiol (E_2);

Rezeptorquelle: Kalbsuterus;

Inkubationsdauer: 20 h bei 0°C ;

Hemmstoffkonzentration: $2,0 \times 10^{-5}$ Mol/l

Abszisse: $\frac{1}{\text{freies } ^3\text{H-Östradiol}}$

Ordinate: $\frac{1}{\text{gebundenes } ^3\text{H-Östradiol}}$

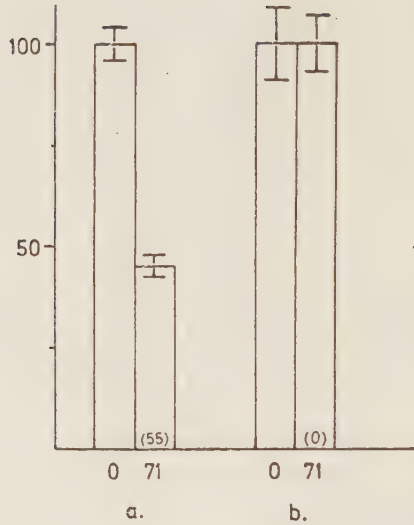


Abb. 39: Reversibilität der Rezeptor-Bindung von 2-Phenyl-4,5-di-(4'-hydroxy-phenyl)-imidazol (Verb.Nr. 71) nach Zugabe von ^3H -Östradiol; Rezeptorquelle: Kalbsuterus; 0: Kontrolle; $^3\text{H-E}_2$: ^3H -Östradiol; I: Inhibitor; I-Konzentration: 2×10^{-5} M; $^3\text{H-E}_2$ -Konzentration: 1×10^{-9} M; (): %-Anteil I-Rezeptor-Komplex;

a. α . I 60 min 0°C ;

β . $^3\text{H-E}_2$ 145 min 0°C ;

b. α . 60 min 0°C ;

β . Entfernung des ungeb. I;

γ . $^3\text{H-E}_2$ 60 min 0°C , 25 min 25°C , 60 min 0°C ;

Ordinate: %-Anteil Östradiol-Rezeptor-Komplex

Die %-Angaben sind Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung aus 2 unabhängigen Versuchen mit je 3 Werten pro Hemmstoffkonzentration.

2.2.4.2. Bestimmung der uterotropen, kolpotropen und antiutero- tropen Eigenschaften der 4,5-Di-(4'-hydroxyphenyl)- imidazole (Verb.Nr. 70-73)

Die Substanzen waren in einem Dosisbereich von 0,33 - 1,4 mg (Verb.Nr. 70 und 71) und 0,28 - 1,1 mg (Verb.Nr. 72 und 73), intra-peritoneal und subcutan appliziert, nicht in der Lage, das Uteruswachstum juveniler Mäuse zu stimulieren.

Ebenfalls ohne Wirkung blieben die Testverbindungen im kolpotropen Test. Das Scheidenepithel ovariectomierter Mäuse zeigte bei einer subcutan und intraperitoneal verabreichten Dosis von 0,33 - 2,7 mg pro Tier keine östrogenen Eigenschaften.

Die rezeptoraffinste Substanz 2-Phenyl-4,5-di-(4'-hydroxyphenyl)-imidazol zeigte in einem Dosisbereich von 0,14 - 1,4 mg pro Tier keine Hemmung des östronstimulierten Uteruswachstums juveniler Mäuse.

Der Substanz-Rezeptor-Komplex scheint in vivo zu reversibel zu sein, um uterotrope, kolpotrope und antiöstrogene Eigenschaften zu entfalten (s. Abb. 39).

2.2.4.3. Hemmung des DMBA-induzierten hormonabhängigen Mamma- carcinoms der SD-Ratte durch 2-Phenyl-4,5-di-(4'-hydro- xyphenyl)-imidazol (Verb.Nr. 71)

Die Behandlung des hormonabhängigen Mammacarcinoms der SD-Ratte mit Verb.Nr. 71 führt ab dem 12. Tag der Therapie zu einem verzögerten Wachstum der Tumoren (s. Abb. 40).

Das Ergebnis konnte statistisch nicht abgesichert werden (s. Tab. 35).

Tabelle 35: Hemmung des DMBA-induzierten Mammatumors der SD-Ratte durch 2-Phenyl-4,5-di-(4'-hydroxyphenyl)-imidazol (Verb.Nr. 71).

Applikation: Montag, Mittwoch, Freitag 30 mg/kg KG ip.

Therapiedauer: 28 Tage

Verb.Nr.	Tier- zahl	Tumor- zahl 100 %	Wirkung								% Tierge- wichtsände- rung **	% Tumor- flächenän- derung*	T/C
			VH		TH		KH		NT				
			Z	%	Z	%	Z	%	Z	%			
Kontr.	10	18	1	6	3	17	14	77	2	11		340	-
71	10	20	-	-	4	20	16	80	4	20		200 ⁺	0,67

VH: völlige Tumorrückbildung

TH: teilweise Tumorrückbildung

KH: keine Hemmung des Tumorwachstums

NT: während der Therapie neu aufgetretene Tumoren

Z: Anzahl der beeinflussen bzw. nicht beeinflussen Tumoren

T/C: Tumorfläche der Therapietiere am 28. Versuchstag

Tumorfläche der Kontrolltiere am 28. Versuchstag

*: Mittelwert am 28. Versuchstag

**: nach einer Woche Therapie

+: kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle ($p > 0,05$)

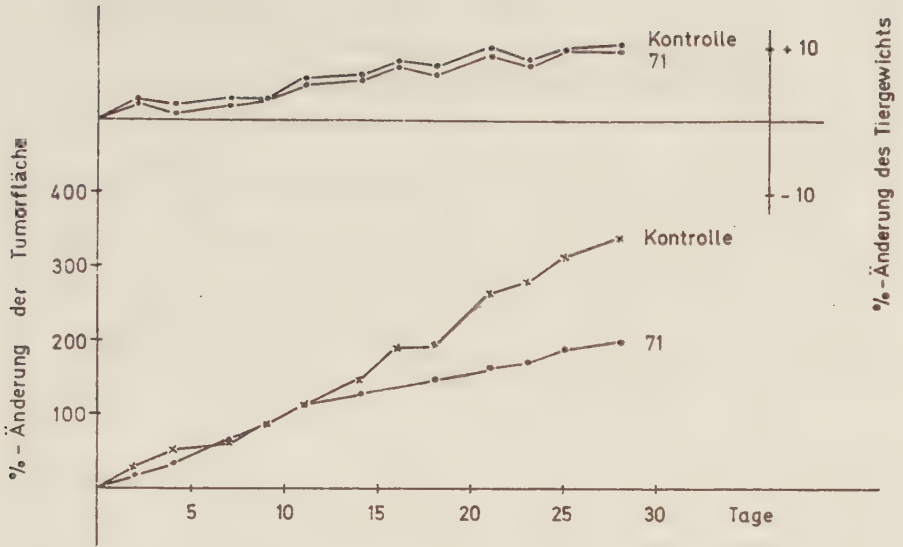


Abb. 40: DMBA-induzierter Mammatumor der SD-Ratte.

Beeinflussung der Tumorfläche und des Körpergewichts nach Behandlung mit 2-Phenyl-4,5-di-(4'-hydroxyphenyl)-imidazol (Verb.Nr. 71).

Applikation: Montag, Mittwoch, Freitag 30 mg/kg KG ip.

Therapiedauer: 28 Tage

2.2.4.4. Hemmung der DNA-, RNA- und Proteinsynthese von Walker-256-Carcinosarkomzellen in vitro durch 4,5-Di-(4'-hydroxyphenyl)-imidazole (Verb.Nr. 71 - 73)

Verb.Nr.	Konzentration (10^{-6} M)	% Hemmung*			Cytocide Wirkung** ED ₅₀ (10^{-4} M)
		DNA	RNA	Protein	
72	100	57 $\pm$ 1,5	48 $\pm$ 2,8	10 $\pm$ 5,4	5,1
73	100	72 $\pm$ 2,1	45 $\pm$ 2,8	19 $\pm$ 9,0	4,5
71	5	32 $\pm$ 4,9	35 $\pm$ 4,2	-	3,2
	7,5	45 $\pm$ 6,3	45 $\pm$ 3,5	-	
	10	56 $\pm$ 5,0	57 $\pm$ 2,5	-	
	25	76 $\pm$ 2,6	75 $\pm$ 2,3	-	
	50	91 $\pm$ 1,8	88 $\pm$ 0,6	-	
	100	-	-	7,3 $\pm$ 4,3	
ED ₅₀ *** (10^{-6} M)		8,4 $\pm$ 2,2	8,0 $\pm$ 2,3	-	-

*: Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung

**: Die Bestimmung der cytociden Wirkung erfolgte mit der Trypanblaufärbung (107); die Berechnung der ED₅₀ durch Interpolation im Wahrscheinlichkeitsnetz.

***: Berechnung der ED₅₀ $\pm$ Standardabweichung nach dem Probitverfahren (109)

Die Verb.Nr. 72 und 73 hemmen die DNA-, RNA- und Proteinsynthese in einem mit Diäthylstilböstrol (dessen Stilbenstruktur sie enthalten) vergleichbaren Ausmaß.

Verb.Nr. 71 scheint im Gegensatz zu den in dieser Arbeit untersuchten Phenolderivaten spezifisch die DNA- und RNA-Synthese zu hemmen. Die ED₅₀ der Uridin- bzw. Thymidineinbauhemmung liegt eine Zehnerpotenz unter der ED₅₀ für die cytocide Wirkung der Substanz.

2.3. Diskussion

2.3.1. Entwicklung antiöstrogener Verbindungen aus Diäthylstilb- öströl und Hexöströl

2.3.1.1. Stellungsisomere Diäthylstilböstrole und Hexöstrole

In unserem Arbeitskreis wurden ausgehend von den bekannten Östrogenen Diäthylstilböströl (4,4'-DES) und Hexöströl (4,4'-HES) die 3,3'- und 2,2'-DES bzw. -HES-Stellungsisomeren mit dem Ziel synthetisiert, bei weitgehender Erhaltung der Rezeptoraffinität zu Verbindungen mit fehlenden oder schwächeren östrogenen Eigenschaften, also zu Antiöstrogenen, zu gelangen.

Die Verlagerung der 4,4'-ständigen OH-Gruppen in die 2,2'-Position führt zu echten Östrogenen, deren Dosis-Wirkungskurven einen parallelen Verlauf zu denen der Ausgangsöstrogene zeigen. Sie erreichen den maximalen uterotropen und kolpotropen Effekt von 4,4'-DES und 4,4'-HES.

Die aus dem Abstand der Dosis-Wirkungsgeraden berechnete uterotrope Aktivität beträgt für 2,2'-HES 0,0068, für 2,2'-DES 0,00057, bezogen auf 4,4'-HES bzw. 4,4'-DES = 1. Die von 2,2'-HES zu 2,2'-DES abfallende Wirkung stimmt mit der unterschiedlichen Affinität zum Östrogenrezeptor überein (2,2'-HES: $K_i = 6,58 \times 10^{-7}$ M; 2,2'-DES: $K_i = 2,7 \times 10^{-6}$ M). Dieser Befund ist erstaunlich, da nach Schueler (57) für den Eintritt einer maximalen Wirkung zwei Hydroxylgruppen an Kohlenstoffatome gebunden sein müssen, die einen Abstand von 8,55 Å aufweisen. Die Zentren der Sauerstoffatome müssen also eine Distanz von etwa 12,45 Å einnehmen. Auch die hohe in vitro-Reversibilität der 2,2'-HES- bzw. 2,2'-DES-Rezeptorbindung ließ nur schwache östrogene Effekte erwarten. Terenius (37) erklärt die schwache uterotrope Wirkung verschiedener Antiöstrogene mit einer hohen Reversibilität ihrer Rezeptorbindung. Ein Grund für die östrogene Wirkung könnte eine Hydroxylierung der Verbindungen in 4,4'-Position sein. Östradiol wird in

der Leber an C₂, C₄, C₆, C₁₆ und C₁₈ hydroxyliert (58), so daß auch für 2,2'-DES und 2,2'-HES ein solcher Metabolismus möglich sein sollte.

Die Reversibilität wäre dadurch abgeschwächt (verstärkte Bindung zum Rezeptor durch zusätzliche Wasserstoffbrückenbindungen) und die Verbindungen in der Lage, sich im Kern anzureichern und dadurch den beobachteten maximalen Effekt auszuüben. Hinweise einer solchen Hydroxylierung geben die Untersuchungen von Metzler (59), der als Metaboliten des 4,4'-DES ringsubstituierte Hydroxy- bzw. Methoxydiäthylstilböstrole isolieren konnte, den Substitutionsort am Aromaten jedoch nicht erwähnt.

Im Gegensatz zu den vorstehenden Versuchen erbrachte die Verlagerung der phenolischen OH-Gruppen in die Position 3,3' Verbindungen mit ausgeprägten antiöstrogenen Eigenschaften.

Die statistische Auswertung der Versuchsergebnisse zeigte, daß die Dosis-Wirkungskurven von 3,3'-DES und 3,3'-HES in der Anfangsphase parallel zu denen des Östriols verlaufen. Sie sind in diesem Bereich nach der von Huggins (46) gegebenen Definition "impeded" Östrogene. Die relativ zu Östriol ($E_3 = 1$) berechnete Aktivität beträgt für 3,3'-HES 0,121, für 3,3'-DES 0,103. Ein Vergleich mit Östron ist aufgrund des unterschiedlichen Wirkungstyps nicht möglich.

Während das Uterusgewicht bei höherer Östrioldosis einen mit Östron vergleichbaren Wert erreicht, bleibt es bei den Verbindungen 3,3'-DES bzw. 3,3'-HES konstant, sobald die maximale Wirkung (ca. 63 % des Östrons) erreicht ist.

Bei 3,3'-HES und 3,3'-DES handelt es sich um Östrogene mit einem gemischten Wirkungsbild; sie sind partielle Agonisten mit einem den "impeded" Östrogenen entsprechenden Verlauf der Dosis-Wirkungskurve. Auch bei Verlagerung der 17 β -ständigen OH-Gruppe im Östradiol in die 16 β -Position wurde eine Veränderung des Wirkungstyps erreicht (46). Aus dem Östrogen entsteht durch diese synthetische Maßnahme ein "impeded" Östrogen, das allerdings den 100 % Wirkungswert des 17 β -Östradiols erreicht. Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus der "impeded" Östrogene, die mit Östradiol (E_2)

und Östriol (E_3) durchgeführt wurden, zeigen, daß beide Substanzen (nach einmaliger Gabe) sich in gleichem Ausmaß in den Zellkernen von "target"-Zellen anreichern (60). E_3 steigert ebenso wie E_2 die Glukoseverwertung, die Wasseraufnahme, den Einbau von ^{14}C -Glucose in Protein, Fette und RNA in "target"-Gewebe, sowie die Aktivität der RNA-Polymerase. Unterschiedlich ist jedoch die Konzentration des Wirkstoff-Rezeptor-Komplexes im Zellkern von E_3 und E_2 , die man 6 Stunden nach Substanzapplikation beobachtet. Die E_2 -Rezeptor-Komplex-Konzentration ist zu diesem Zeitpunkt signifikant erhöht. Der entsprechende E_3 -Komplex ist nicht mehr nachweisbar. Dementsprechend beobachtet man nach E_2 -Gabe innerhalb von 24 Stunden eine Steigerung des Uteruswachstums, während E_3 unter den gewählten Versuchsbedingungen keinen Effekt ausübt. Da E_2 und E_3 gleiche Affinitäten zu membranständigen Proteinen, welche den Transport in die "target"-Zelle regeln, sowie zu cytoplasmatischen und nuklearen Rezeptorproteinen aufweisen, muß der unterschiedliche uterotrope Effekt der beiden Substanzen mit einer kürzeren Verweildauer des E_3 -Rezeptorkomplexes im Zellkern erklärt werden. Ein Hinweis für die Richtigkeit dieser Annahme ist die Beobachtung, daß, in höheren Dosen und zeitlich kürzeren Intervallen verabreicht, E_3 den gleichen maximalen Effekt wie E_2 hervorruft (46). Mit 3,3'-DES und 3,3'-HES wurden derartige Untersuchungen nicht durchgeführt.

Die antiöstrogene Wirkung von 3,3'-HES (53 % bei 5 μ) und 3,3'-DES (48 % bei 5 μ) liegt in der gleichen Größenordnung wie die von Nafoxidin (42 % bei 60 μ). Von Interesse ist jedoch, daß sich die Dosen, mit welchen diese Wirkungen erzielt werden, beträchtlich unterscheiden.

Da bei einer Dosis von 5 μ mit 3,3'-DES und 3,3'-HES nur schwache uterotrope Effekte erzielt werden, ist der Maximalwert der antiuterotropen Wirkung von rund 50 % durch das Wechselspiel agonistischer und antagonistischer Eigenschaften nicht erklärbar. Bei Nafoxidin, das in einer Dosis, die zu maximalen antiuterotropen Effekten führt, auch optimale östrogene Effekte auslöst, kann eine solche Erklärung für das Fehlen einer 100 %igen Hemmung der Östronwirkung herangezogen werden. Da Östrogene in niedriger Dosierung zu einer Stimulierung des Mammatumwachstums führen, ist

die Beobachtung von großem Interesse, daß sich mit 3,3'-DES und 3,3'-HES maximale antiuterotrope Effekte in einem Dosierungsbereich erzielen lassen, in dem noch keine merklichen uterotropen Effekte nachweisbar sind. Für Nafoxidin konnte eine Stimulierung des Tumorwachstums bei ovariectomierten Ratten mit Mammatumoren festgestellt werden (61). Gallez warnt auf Grund dieser Feststellung vor einer therapeutischen Verwendung des Nafoxidins bei einer Behandlung des hormonabhängigen Mammatumors. Bei 3,3'-DES und 3,3'-HES können bei entsprechender Dosierung (2 mg/kg) maximale Östrogenantagonistische und damit antitumorale Effekte ohne Inkaufnahme merklicher Östrogenen Nebenwirkungen erzielt werden.

Auf Grund der vorstehend erläuterten Versuche lassen sich die neuen Antiöstrogene 3,3'-DES und 3,3'-HES wirkungsmechanistisch weder dem Östriol, noch dem Nafoxidin zuordnen. Für das Nafoxidin existieren folgende Vorstellungen zum Wirkungsmechanismus:

Nafoxidin hemmt die Aufnahme von ^3H -Östradiol in den Uterus in vivo und in vitro (38, 36, 37). In vitro-Versuche mit Nafoxidin haben (in Übereinstimmung mit den in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnissen mit Nafoxidin; gleichartige Befunde wurden auch mit 3,3'-DES und 3,3'-HES erzielt) einen kompetitiven Antagonismus zum cytoplasmatischen Östrogenrezeptor ergeben (39). Nafoxidin verdrängt in hohen Dosen E_2 quantitativ vom Rezeptor und verhindert dadurch die uterusstimulierenden Effekte des endogenen E_2 .

Die nur 41 %ige Hemmung des Uteruswachstums juveniler, Östron-stimulierter Mäuse ist möglicherweise auf die Östrogenen Eigenwirkungen von Nafoxidin zurückzuführen. Der Dosis-Wirkungsverlauf von Nafoxidin entspricht dem der echten Östrogene. Die relative Aktivität, bezogen auf 4,4'-DES = 1, beträgt 0,128. Im Vergleich zu 3,3'-DES und 3,3'-HES ist Nafoxidin ein relativ starkes Östrogen.

Der partielle Agonist Nafoxidin ist im Gegensatz zu Östriol (Verweildauer im Kern < 6 Stunden) nach einmaliger Applikation außerordentlich lang (19 Tage) im Kern nachweisbar. Während der anti-östrogene Effekt der von Huggins (46) beschriebenen "impeded"-Östrogene durch hohe Gaben dieser Verbindungen wieder aufgehoben

wird, führen Nafoxidin und auch 3,3'-DES und 3,3'-HES in höheren Dosen zu keiner Änderung der Hemmeffekte.

Für Östriol und Nafoxidin sind unterschiedliche Wirkmechanismen anzunehmen. Östriol wirkt möglicherweise nur auf Grund seiner hohen Affinität zum cytoplasmatischen und nuklearen Östrogenrezeptor und seiner in niederen Dosen wenig ausgeprägten Eigenwirkung als Antagonist (maximale Hemmwirkung 26 % (46)) (60).

Nafoxidin entfaltet vermutlich seine antiöstrogenen Effekte durch das Fehlen der Eigenschaft, die Biosynthese des verbrauchten cytoplasmatischen Rezeptors zu stimulieren (40). Die antiöstrogene Wirkung beruht somit auf einem Entzug des Rezeptors für endogenes Östradiol.

Neben den bisher diskutierten Wirkungsmechanismen von Antiöstrogenen

a) schwache "intrinsic activity" bei hoher Affinität, wie im Falle der "impeded" Östrogene (Verdrängung des endogenen Östrogens durch ein schwaches Östrogen, volle östrogene Wirkung erst im hohen Dosisbereich),

b) Verhinderung östrogenen Effekte durch Hemmung der Rezeptorsynthese,

bestehen noch folgende theoretische Mechanismen für eine mögliche antiöstrogene Wirkung:

c) Beeinflussung des Transports des endogenen Östradiols in die Zelle durch Hemmung der Östradiol-Carrier-Wechselbeziehung (Hemmung der erleichterten Diffusion?). Ein Eingriff von Antiöstrogenen in diesen Transportmechanismus wurden bisher nicht nachgewiesen.

d) Eine Behinderung ist denkbar durch Hemmung des Übergangs des cytoplasmatischen Östrogen-Rezeptor-Komplexes (5,3 bzw. 8 S) in den kerngängigen bei 5 bzw. 4,5 S sedimentierenden Östradiol-Rezeptorkomplex. Rochefort (62) zeigt an einem in vitro-System aus Rattenuterus am Beispiel von Nafoxidin einen im Vergleich zu Östradiol verlangsamten, sowie nicht quantitativen Transport des Nafoxidin-Rezeptorkomplexes aus dem Cytoplasma in den Kern.

e) Ein weiterer möglicher Wirkungsmechanismus wäre, daß der Inhibitor zwar die Bildung eines kerngängigen nuklearen Rezeptors erlaubt, der aber zu keiner Genaktivierung in der Lage ist.

Ein besonderer Fall sind Verbindungen mit hoher Reversibilität. Für die unterschiedliche östrogene Wirkung hoch rezeptoraffiner Substanzen (niedere K_i -Werte) macht Terenius (37) die unterschiedliche Reversibilität der Rezeptorbindung dieser Substanzen verantwortlich. Es ist denkbar, daß Antiöstrogene über einen solchen Mechanismus ihre Wirkung entfalten.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Beziehung zwischen dem Ausmaß der Reversibilität und der antiöstrogenen Wirkung in der Reihe 3,3'-HES = 3,3'-DES < Nafoxidin festgestellt. Nafoxidin zeigt dementsprechend schwächere antiuterotrope Effekte als die weniger reversiblen Verbindungen 3,3'-HES und 3,3'-DES. Die im Vergleich zu Nafoxidin in niedrigeren Dosen erreichbare antiöstrogene Wirkung von 3,3'-DES und 3,3'-HES kann mit der höheren Rezeptoraffinität dieser Verbindungen und der geringeren Reversibilität der Inhibitor-Rezeptor-Komplexe erklärt werden.

Zu b) der Hemmung der Genaktivierung durch Inhibitoren liegen Untersuchungen von Katzenellenbogen (42) an einem östrogenabhängigen in vitro-System mit Rattenuteri als 'target'-Organ und den Antiöstrogenen CI-628, einer Verbindung vom Clomiphentyp, Nafoxidin und DMS vor. Bestimmt wurden bei diesen Untersuchungen das östrogeninduzierte Protein (IP). CI-628 stimuliert die IP-Synthese kaum, es hemmt jedoch die durch E_2 induzierte IP-Synthese. Nafoxidin initiiert IP in geringem Maße, es hemmt die E_2 -bedingte IP-Synthese nicht. DMS, ein Antiöstrogen mit minimaler östrogenen Eigenwirkung, ruft eine hohe IP-Synthese hervor, hemmt aber die E_2 -ausgelöste IP-Bildung nicht.

Die Befunde von Katzenellenbogen mit Nafoxidin, das im klinischen Versuch am Mammacarcinom deutlich wirksam ist, stehen mit einem Wirkungsmechanismus, bei dem eine verzögerte Aufnahme des Inhibitor-Rezeptorkomplexes in den Kern bzw. eine Hemmung der Rezeptor-neosynthese beobachtet wird, im Einklang.

Widersprüchlich ist jedoch der Befund mit DMS, das im Tierversuch nur minimale östrogene Eigenwirkung und antiöstrogene Effekte nur bei lokaler Applikation an der Vagina sowie keine antitumoralen Effekte beim Mammacarcinom aufweist, während es in vitro zu einer hohen IP-Synthese befähigt ist. Da mit 3,3'-DES und 3,3'-HES keine Untersuchungen auf subzellulärer Ebene durchgeführt wurden, sind mechanistische Aussagen nur beschränkt möglich.

Die bisherigen Ausführungen haben gezeigt, daß die Verlagerung der phenolischen OH-Gruppen von 4,4'-DES und 4,4'-HES in die 3,3'-Positionen nur zu einer leichten Abnahme der Rezeptoraffinität führt, während die agonistische (östrogene) Wirkung stark reduziert wurde. Auf Grund der hohen Rezeptoraffinität und der schwach östrogenen Eigenschaften resultieren Antiöstrogene, die in die Klasse der partiellen Agonisten einzuordnen sind. Die nur geringfügige Abnahme der Rezeptoraffinität ist auch deshalb erstaunlich, da für die Bindung der Östrogene an den Rezeptor den Hydroxylgruppen eine große Bedeutung zugesprochen wird und ein Abstand beider OH-Reste von 12,55 Å gefordert wird.

Auf Grund von Röntgenstrukturanalysen ermittelten Hospital und Mitarb. (63, 64) für das starrgebaute unsymmetrische Steroid Östradiol einen Abstand der Sauerstoffatome $O_3 - O_{17\beta}$ von 10,92 Å; für das 4,4'-Diäthylstilböstrol mit den trans-ständigen Arylresten fanden die Autoren einen Abstand der Sauerstoffatome 4 - 4' von 12,13 Å. Die Abstände der Sauerstoffatome $O_3 - O_{16\alpha}$ im "impeded"-Östrogen Östriol betragen nach Cooper und Mitarb. (65) 11,26 Å, die der Sauerstoffatome $O_3 - O_{17\beta}$ 10,95 Å.

Messungen an einem Dreiding-Stereomodell der isomeren Stilböstrole ergaben für die Abstände der Sauerstoffatome im 3,3'-DES-Molekül 11,0 Å, die Werte für das 2,2'-DES betragen 7,0 Å. Die entsprechenden, am Modell gemessenen Abstände der Sauerstoffatome, betragen für 4,4'-HES 11,9 Å, für 3,3'-HES 11,1 Å und für 2,2'-HES 7,2 Å.

Die geringen Abweichungen des $O_3 - O_{3'}$ -Abstandes im 3,3'-DES und 3,3'-HES Molekül vom $O_3 - O_{17\beta}$ -Abstand im Östradiol erklären die hohe Rezeptoraffinität dieser beiden Verbindungen, jedoch nicht

ihre geringe agonistische Wirkung (wenn man den Abstand der beiden OH-Gruppen als wesentlich für eine biologische Wirkung betrachtet).

Anscheinend toleriert der Östrogenrezeptor Abweichungen der Sauerstoffabstände, soweit es die Bindung zum Rezeptor betrifft. Hinsichtlich der agonistischen Wirkung scheinen jedoch Abstandsabweichungen zu Änderungen des Wirkungstyps (z.B. Übergang von echten Östrogenen zu partiellen bzw. "impeded"-Östrogenen) zu führen.

Das Wirkungsbild eines echten Östrogens, gefunden bei 2,2'-DES und 2,2'-HES, kann nur mit der Bildung eines biologisch aktiven Metaboliten erklärt werden.

Von großem Interesse ist auch die Feststellung, daß 3,3'-HES und in noch stärkerem Maße das 2,2'-HES sich von den entsprechenden DES-Verbindungen bezüglich ihrer Rezeptoraffinität unterscheiden, während bei den entsprechenden 4,4'-OH-Verbindungen gleiche Konstanten gemessen werden. Die phenolischen OH-Gruppen scheinen bei der Bindung an den Rezeptor neben der hydrophoben Bindung beteiligt zu sein. Die Ausbildung der Wasserstoffbrückenbeziehungen über die beiden phenolischen OH-Gruppen zu Akzeptorresten im Rezeptormolekül scheint auf Grund der Flexibilität des HES-Moleküls eher gegeben zu sein, als im starren DES-Molekül, das einer Näherung der OH-Atome zu den Akzeptoren Widerstand entgegensetzt.

Verb.	K_1 (nM)	Abstand der Sauerstoffatome Å	östrogener Wirktyp	antiöstrogene Wirkung
4,4'-HES	1,6	11,9	echt	-
4,4'-DES	1,2	12,13	echt	-
3,3'-HES	5,0	11,1	impeded+ partiell	+
3,3'-DES	6,4	11,0	impeded+ partiell	+
2,2'-HES	660	7,2	echt	-
2,2'-DES	2700	7,0	echt	-
17 β -E ₂	0,45	10,92	echt	-

Wasserstoffbrückenbindungen sind stark gerichtete Kräfte (66) und erfordern daher eine entsprechende Anordnung von Donor- und Akzeptorgruppen im Wirkstoff- und Rezeptormolekül. Nach Gill (67) sind jedoch Abstände zwischen Donor- und Akzeptormolekül bis zu 2,7 Å möglich; darüber hinaus ($> 3,0$ Å) wirken nur noch sehr schwache Anziehungskräfte. Die mit 4,4'-DES und 4,4'-HES vergleichbaren Affinitäten und Reversibilitäten der entsprechenden Isomeren mit 3,3'-OH-Gruppen deuten an, daß Brückenbeziehungen zu entsprechenden Akzeptorgruppen im Rezeptor betätigt werden können. Die Akzeptorgruppierungen, welche eine Auslösung optimaler agonistischer Effekte nach Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen möglich machen, werden von den OH-Gruppen des 3,3'-DES und 3,3'-HES nicht erreicht.

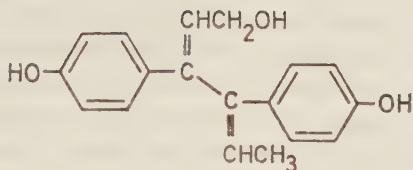
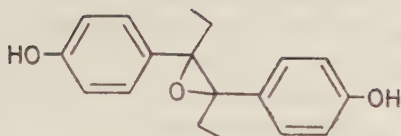
Die Prüfung von 3,3'-DES und 3,3'-HES zeigte eine deutliche Überlegenheit dieser Verbindungen am hormonabhängigen Mammacarcinom im Vergleich zu Nafoxidin.

Der Wirkungsmechanismus dieser Substanzen scheint vorzugsweise auf der antiöstrogenen Wirkung dieser Substanzen zu beruhen, da unbeeinflusste Tumoren, deren Trägartiere im Anschluß an den Therapieversuch ovariectomiert wurden, nicht zurückgingen und somit die Autonomie dieser Tumoren bestätigt wurde. In in vitro-Versuchen an Walker-256-Carcinosarkomzellen lassen sich mit 3,3'-DES und 3,3'-HES vergleichbare cytocide Effekte (ED_{50} 2,4 bzw. 1,5 $\times 10^{-4}$ M) nachweisen. Auch die DNA-, RNA- und Proteinsynthese, deren Hemmung als Ursache antitumoraler Effekte diskutiert wird, wird deutlich beeinflußt. Bereits in früheren Arbeiten wurde als Mechanismus der Antitumorwirkung von 4,4'-DES beim Prostatacarcinom - neben einem Angriff am Endokrinium - direkte zelltoxische Effekte dieser Verbindung diskutiert. So hemmt 4,4'-DES die Furchungsteilung von Seeigelleiern bereits in einer Dosis von 0,5 $\mu\text{g/ml}$ (90). Nach Untersuchungen von Dietrich (68) hemmen die synthetischen Östrogene 4,4'-DES und 4,4'-HES die Atmung von Ehrlich Aszitestumorzellen.

Da wir auch für Nafoxidin vergleichbare cytocide (ED_{50} 1,5 $\times 10^{-4}$ M) Nukleinsäure- und Proteinbiosynthese hemmende Effekte nachweisen konnten, lassen sich die zelltoxischen Eigenschaften

von 3,3'-DES und 3,3'-HES nicht zur Erklärung ihrer besseren mammatumorerhemmenden Wirkung heranziehen. Die Feststellung, daß 3,3'-DES am hormonunabhängigen Yoshida-Sarkom (4) keine Wirkung aufweist, zeigt, daß die cytotoxischen Effekte dieser Substanzen für die Mammatumorstörung keine Bedeutung haben. Wahrscheinlicher ist, daß die relativ starken östrogenen Eigenschaften des Nafoxidins seinen antiöstrogenen Effekten entgegenwirken und so insgesamt zu einer geringeren Tumorerhemmung führen. Auch die vergleichsweise schwächeren antiöstrogenen Eigenschaften des Nafoxidins, die sich auch in der höheren Reversibilität seiner Rezeptorbindung äußern, können für die geringere Tumorstörung herangezogen werden. Entscheidend für das bessere Abschneiden von 3,3'-DES und 3,3'-HES dürfte die Tatsache sein, daß beide Verbindungen in der für die Tumorstherapie benutzten Dosis von 2 mg/kg nur geringe östrogene Nebenwirkungen aufweisen, während Nafoxidin in diesem Dosisbereich bereits maximal östrogen wirksam ist. Auf die Stimulierung latenter Mammatumoren bei ovariectomierten DMBA-behandelten Ratten durch Nafoxidin wird hingewiesen (61). Daß die östrogenen Nebenwirkungen tatsächlich zu einer Verschlechterung des therapeutischen Ergebnisses bei der Behandlung des Mammacarcinoms führen können, zeigt ein Versuch mit 3,3'-DES in einer Dosis von 8 mg/kg, bei dem der T/C-Wert nur mehr 0,8 beträgt und nicht mehr signifikant ist. In diesem Dosisbereich zeigt 3,3'-DES seine maximale östrogene Wirkung, die den antiöstrogenen Effekten, die für die Antitumorstörung verantwortlich sind, entgegenwirkt.

Umgekehrt sind in der niederen Dosis von 0,5 mg/kg 3,3'-DES trotz fehlender östrogenen Effekte die antiöstrogenen Eigenschaften zu schwach, um die Tumoren maximal zu beeinflussen. Die Antitumoreffekte am hormonabhängigen Mammacarcinom von 3,3'-DES und 3,3'-HES sind prinzipiell vergleichbar. Doch wird dem 3,3'-HES für eine weitere Prüfung auf Verwendbarkeit beim Menschen, die zur Zeit durchgeführt wird, der Vorzug gegeben, da bei 4,4'-DES die Bildung von Metaboliten mit möglicher carcinogener Wirkung von Metzler (59) wahrscheinlich gemacht wurde.



Beim Menschen wurde über das Auftreten von Vaginaltumoren bei Töchtern von 4,4'-DES behandelten Patientinnen berichtet (117). Auf Grund der cancerogenen und teratogenen Eigenschaften des 4,4'-DES warnt auch die Arzneimittelkommission der Deutschen Ärzteschaft vor einer therapeutischen Anwendung dieser Substanz (116).

Der Vergleich von 3,3'-DES mit 4,4'-DES am hormonabhängigen Mammatumor der Ratte zeigt deutlich den Vorteil der neuen Substanz.

Während mit 3,3'-DES schon im 2 mg-Bereich eine Tumorflächenänderung von -19 % erreicht wird, beträgt sie bei 4,4'-DES in der vergleichbaren Dosierung von 1,9 mg +25 %. Die im Dosisbereich von 6 mg 4,4'-DES beobachtete deutliche Wirkung (-13 %) wird mit toxischen Nebeneffekten, die sich in Haarausfall und Tiergewichtsreduktion (-12 %) äußern, erkauft. Auch beim Menschen werden als Nebenwirkungen der 4,4'-DES-Therapie Abbruchblutungen, Wasserretention, Hypercalcämie und Übelkeit (70) beobachtet.

2.3.1.2. N-isostere Hexöstrole: N,N'-Dialkyl-1,2-diaryl-äthylen-diamine (Verb.Nr. 21a, b, c bis 69a, b, c)

Ausgehend von N,N'-Dimethyl-1,2-di-(4'-hydroxyphenyl)-äthylendiamin - aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit zu Hexöstrol (Austausch der C-Atome 2 und 5 der Hexankette durch NH) als isosteres Hexöstrol bezeichnet (71) - wurde in unserem Arbeitskreis in den vergangenen Jahren eine systematische Abwandlung dieses Verbindungstyps vorgenommen. Das Ziel dieser Untersuchungen ist die Auf-
findung von Verbindungen, die sich für die Therapie des menschlichen Mammacarcinoms eignen.

4,4'-HES und 4,4'-DES werden bei der Brustkrebsbehandlung im Spätstadium eingesetzt. Der therapeutische Erfolg - zeitlich begrenzter Rückgang der Tumoren, verbunden mit einer Verlängerung der Lebensdauer - wird mit zahlreichen Nebenwirkungen, die auf die östrogene Wirkung der beiden Verbindungen zurückzuführen sind, erkauft.

Bei diesen und den im vorhergehenden Abschnitt beschriebenen Untersuchungen wurde angestrebt, die östrogene Eigenschaft des Hexöstrols von der tumorhemmenden abzutrennen. In den Dissertationen von Hoffmann (6) und Taneja (7) werden tumorhemmende N,N'-Dialkyl-1,2-diphenyl-äthylendiamine beschrieben und die möglichen Wirkungsmechanismen dieser Stoffklasse diskutiert.

Aufgabe der hier beschriebenen Untersuchungen ist es, die Affinität zum Östrogenrezeptor, sowie die östrogenen bzw. antiöstrogenen und tumorhemmenden Eigenschaften dieser Verbindungen zu untersuchen und somit Angaben über den Wirkungsmechanismus der tumorhemmenden N,N'-Dialkyl-1,2-diphenyl-äthylendiamine zu ermöglichen.

Es wurden die diastereomeren N,N'-Dialkyl-1,2-diaryl-äthylendiamine (a = racem, b = meso) und die bei ihrer Herstellung als Nebenprodukt anfallenden N-Alkyl-arylmethylamine (c), die in Vorversuchen eine gewisse Wirkung am Mammatumor der Ratte zeigten, in einer Konzentration von 2×10^{-5} M am Östrogenrezeptor geprüft.

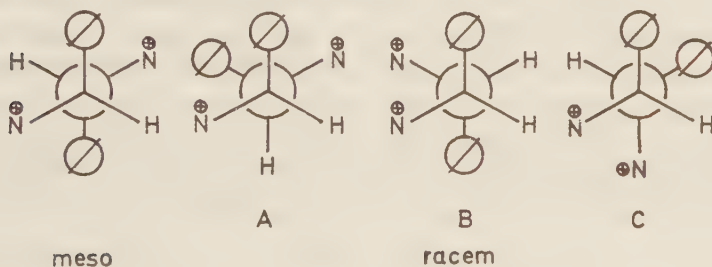
Keine der 32 geprüften, im Ring unsubstituierten diastereomeren N,N'-Dialkyl-1,2-diphenyl-äthylendiamine zeigten eine Affinität zum Östrogenrezeptor, obwohl racem-N,N'-Di-3-methylbutyl-1,2-diphenyl-äthylendiamin (Verb.Nr. 31a) und meso-N,N'-1,2,2-Trime-thylpropyl-1,2-diphenyl-äthylendiamin (Verb.Nr. 34b) eine statistisch abgesicherte Wirkung (6) am hormonabhängigen DMBA-induzierten Mammatumor der SD-Ratte zeigten. Verbindungen mit einer phenolischen OH-Gruppe in Position 4' von N,N'-Dialkyl-1,2-diphenyl-äthylendiaminen erwiesen sich jedoch als rezeptoraffin (72). Die beste Wirkung zeigte mit einem K_i -Wert von $1,6 \times 10^{-7}$ M racem-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(4'-hydroxyphenyl)-äthylendiamin.

Eine zusätzliche OH-Gruppe in 4'-Stellung führt also von einer nicht rezeptoraffinen Verbindung (Verb.Nr. 25a) zu einer Verbindung mit hoher Affinität. Durch eine OH-Substitution ist das Molekül in der Lage (wie 4,4'-DES und 4,4'-HES), über phenolische OH-Gruppen eine Wasserstoffbrückenbindung mit einem Akzeptor im Rezeptorareal einzugehen. Die Lipophilie der unsubstituierten Aromaten reicht anscheinend nicht aus, um über hydrophobe Kräfte eine Bindung zum Rezeptor zu erreichen, die denen der OH-Verbindungen ähnlich ist.

Eine Erhöhung der Lipophilie durch Ringerweiterung bei Verb.Nr. 25a führt trotz fehlender OH-Gruppen bei der neuen Verb.Nr. 67a (racem-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(1-naphthyl)-äthylendiamin) zu einer Rezeptoraffinität. Die Hemmung der Östradiol-Rezeptor-Wechselbeziehung ist im Konzentrationsbereich 2×10^{-5} M signifikant.

Die fehlende Rezeptoraffinität von meso-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(4'-hydroxyphenyl)-äthylendiamin und meso-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(1'-naphthyl)-äthylendiamin gegenüber den Racematen verdeutlicht den Einfluß des räumlichen Baus auf die Pharmakon-Rezeptor-Wechselbeziehung.

R. Schönenberger et al. (73) konnten aufgrund der unterschiedlichen NMR-Spektren von diastereomeren ADA x 2 HCl eindeutige konfigurative Zuordnungen treffen.



Nach diesen Untersuchungen liegen die diprotonierten N,N'-Dialkyl-1,2-diphenyl-äthylendiamine ausschließlich in einer Konformation vor (bei den Racematen in Konformation A). Es ist jedoch anzunehmen, daß N,N'-Dialkyl-1,2-diphenyl-äthylendiamine als schwache

Basen nur zu einem geringen Anteil in der diprotonierten Form vorliegen (eingehende Untersuchungen über die pK-Werte der Verbindungen fehlen) und daher vorwiegend in der Konstellation B existent sind. Vermutlich ermöglicht die cis-Ständigkeit der beiden Alkylaminogruppen in dieser Konstellation eine optimale Wechselbeziehung zum hydrophoben Rezeptorareal. Ferner dürfte durch die räumliche Nachbarschaft der beiden N-Alkylreste die Ausbildung von Hydrathüllen, die die Rezeptor-Wechselbeziehung abschwächen, behindert sein. Schon im Hinblick auf den von Schueler (57) für eine optimale Rezeptor-Wechselbeziehung geforderten Abstand beider OH-Gruppen von 12,55 Å kommt für die affine Verbindung N,N'-Dibutyl-1,2-di-(4'-hydroxyphenyl)-äthylendiamin nur Konformation B in Betracht.

Der Vergleich der Rezeptoraffinität der Verbindungen racem-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(4'-hydroxyphenyl)-äthylendiamin und racem-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(1'-naphthyl)-äthylendiamin unterstreicht die Bedeutung von OH-Gruppen bei der Bindung von Wirkstoffmolekülen an Östrogenrezeptoren. Bei meso-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(4'-hydroxyphenyl)-äthylendiamin wird trotz der optimalen OH-Abstände keine meßbare Bindung zum Östrogenrezeptor erreicht. Vermutlich behindern die hier transständigen Alkylaminogruppen die hydrophobe Wechselwirkung zum Rezeptor (oder eventuell die Wasserstoffbrückenbeziehung). Die Bedeutung der Wasserstoffbrückenbeziehung für die Bindung zum Rezeptor wird auch durch das Fehlen einer Affinität verschiedener Aether (Aethyl-, Propyl-, Butyl- und Benzyläther) von racem-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(4'-hydroxyphenyl)-äthylendiamin (Verb. Nr. 51a - 55a) demonstriert. Auch Mestranol, der Methyläther des Aethinylöstradiols, eine Substanz, die Bestandteil der meisten hormonalen Kontrazeptiva ist, besitzt in vitro keine Östrogenrezeptoraffinität (74); sie wird in vivo zur Wirkform metabolisiert.

Versuche, den hydrophoben Charakter des N,N'-Dibutyl-1,2-diphenyl-äthylendiamins durch eine Monosubstitution mit einer CH_3 -, F-, Cl-, Br-, J- oder C_6H_5 -Gruppe in den Positionen 2', 3' oder 4' des Phenylrestes (Verb.Nr. 37a, b - 48a, b) so zu verstärken, daß die hydrophobe Wechselwirkung für eine stabile Bindung an das Rezeptorprotein ausreichend ist, schlugen fehl.

Die Substitution mit basischen Gruppen, wie beispielsweise Dimethylamin und Diäthylamin (Verb.Nr. 56a, b, c; 57a, b, c) oder mit einer Nitrilgruppe (Verb.Nr. 50a, b, c) in 4-Stellung, erbrachte ebenfalls keine Rezeptoraffinität.

Die Substitution von jeweils zwei Chloratomen in die Benzolringe von N,N'-Dialkyl-1,2-diphenyl-äthylendiamin führte zu rezeptoraffinen Verbindungen. Von den N,N'-Dialkyl-1,2-di-(2',4'-; 3',4'-; bzw. 2',6'-dichlorphenyl)-äthylendiaminen zeigen nur die diastereomeren 2',6'-Dichlorprodukte (Verb.Nr. 62a, b bis 64a, b) eine Östrogenrezeptoraffinität und dabei interessanterweise sowohl die Racem- als auch die Mesoform. Nach der Regel - Verteilungskoeffizient $K_{\text{racem}} > K_{\text{meso}}$, Löslichkeit in protonischen und dipolaren aprotonischen Solventien bei Racemat $>$ Mesoform und Kristallisationsfolge in den gleichen Lösungsmitteltypen Mesoform: Fraktion 1, Racemform: Fraktion 2 - ordnete Taneja (7) die Diastereomeren der Verb.Nr. 62 bis 64 zu.

Die angenommene Konfiguration der Verbindungen läßt sich durch die $^1\text{HNMR}$ -Spektren von ADA x 2 HCl nicht absichern; hier treten aufgrund von raumfüllenden Substituenten Abweichungen von der geforderten Bandenverschiebung auf, die weitere $^1\text{HNMR}$ -spektroskopische Untersuchungen an den Imidazolidinen dieser Verbindungen erforderlich machen.

Für die nach oben genannten Regeln zugeordneten Diastereomeren ergaben sich keine einheitlichen Zusammenhänge zwischen Konfigurationen und Affinität.

Auf Grund der Versuche mit N,N'-Dibutyl-1,2-di-(4'-hydroxyphenyl)-äthylendiamin wäre eine bessere Rezeptoraffinität der Racemate zu erwarten gewesen. Im vorliegenden Fall war nur bei Verb.Nr. 62 das Racemat, bei den Verb.Nr. 63 und 64 jedoch die Mesoform affiner.

Eine abschließende Beschreibung der konfigurativen Einflüsse auf die Wirkstoff-Rezeptor-Wechselbeziehung kann jedoch erst nach endgültiger sterischer Zuordnung erfolgen. Das Fehlen einer Rezeptoraffinität bei den 2',4'- und 3',4'-Dichlorprodukten (Verb.Nr. 58a,

b - 61a, b und 66a, b), sowie bei N,N'-Dibutyl-1,2-di-(2',6'-dichlorphenyl)-äthylendiamin (Verb.Nr. 65a, b), erklären wir nur mit sterischen Einflüssen, da der lipophile Charakter dieser Verbindungen eine hydrophobe Wechselbeziehung zum Rezeptor im vergleichbaren Ausmaß wie die als affin erkannten Verbindungen (Verb.Nr. 62a, b - 64a, b) erwarten läßt.

Die Bedeutung solcher sterischen Einflüsse auf die hydrophobe Wechselwirkung ist auch von anderen Stoffklassen her bekannt (75).

Im allgemeinen wird die Bindung von Wirkstoffmolekülen an Proteine mit zunehmender Substitution von Halogenatomen vergrößert. Die Bindung ist umso stärker, je größer das Atomgewicht des Halogens ist. Es ist jedoch so, daß die freie Reaktionsenergie ΔF_o , die aus einer Halogensubstitution resultiert, von Wirkstoffmolekül zu Wirkstoffmolekül sehr verschieden ist, wofür unter anderem die sterischen Faktoren mitverantwortlich sind (75).

Entsprechend unserem Testsystem wurden die rezeptoraffinen N,N'-Dialkyl-1,2-di-(2',6'-dichlorphenyl)-äthylendiamine (Verb.Nr. 62a, b - 64a, b), sowie racem-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(1'-naphtyl)-äthylendiamin (Verb.Nr. 67a) weiter auf kolpotrope und uterotrope Aktivität an der Maus geprüft. Keine der Substanzen zeigte trotz ihrer merklichen in vitro-Aktivität zum Östrogenrezeptor östrogene Eigenschaften. Auch die Prüfung auf antiöstrogene Wirkung der Substanzen verlief negativ. Zur Klärung dieses erstaunlichen Befundes - bei fehlenden Östrogenen Eigenschaften, aber hoher Rezeptoraffinität war mit antiöstrogenen Effekten zu rechnen - wurden Reversibilitätsversuche der Wirkstoff-Rezeptor-Bindung am Beispiel der affinen Vertreter (Verb.Nr. 64a und b) vorgenommen. Nur der Befund mit der Racemform - ihre Rezeptorbindung war hoch reversibel - erklärt die fehlende agonistische und antagonistische Wirkung. Im Falle der Meso-Verbindung war der Inhibitor-Rezeptor-Komplex hoch stabil, so daß für diese Verbindung andere Ursachen als Grund der fehlenden Östrogenen bzw. antiöstrogenen Wirkung in Frage kommen.

Fehlende oder schwache östrogene und antiöstrogene Eigenschaften bei Verbindungen mit hoher Rezeptoraffinität werden von Terenius (37) mit einer hohen Reversibilität der Wirkstoff-Rezeptor-Bindung erklärt. So zeigt z.B. meso-Butöstrol nur bei lokaler vaginaler Anwendung antiöstrogene Eigenschaften, während es bei subcutaner Applikation unwirksam ist. Auch die flachen Dosis-Wirkungskurven der "impeded" Östrogene deutet Terenius mit einer kurzen Verweildauer des Pharmakons am Rezeptor.

Bei den 1,2-Diphenyl-äthylendiaminen ist daneben auch eine Metabolisierung des Wirkstoffs zu inaktiven Folgeprodukten als Ursache der fehlenden östrogenen und antiöstrogenen Eigenschaften zu diskutieren. Dieses Problem kann durch Untersuchungen auf zellulärer (am hormonabhängigen MCF-7 Mammatumor in vitro (44)) oder subzellulärer Ebene durch Untersuchungen zur Hemmung der Östrogen-induzierten Proteinsynthese (IP) an isolierten Uteri (42) geklärt werden.

In Übereinstimmung mit der fehlenden antiöstrogenen Wirkung ist das nicht signifikante Ergebnis bei der Prüfung am DMBA-induzierten hormonabhängigen Mammacarcinom der Ratte, die mit der rezeptoraffinsten, wenig reversiblen Verb.Nr. 64b durchgeführt wurde. Ein Wirkungsmechanismus, der auf möglichen cytotoxischen und rezeptoraffinen Eigenschaften dieses Verbindungstyps beruht (selektive Antitumorwirkung durch Anreicherung cytotoxischer Verbindung in der Mammatumorzelle), konnte ausgeschlossen werden, da in vitro nur eine schwache Absterberate der Tumorzellen und nur eine geringe Hemmung der DNA-, RNA- und Proteinsynthese feststellbar war.

Da sowohl mit rezeptoraffinen (72), als auch mit nicht rezeptoraffinen (6) 1,2-Diphenyl-äthylendiaminen mammatumورهemmende Effekte nachgewiesen werden konnten, bedarf es weiterer Anstrengungen zur Aufklärung des Wirkungsmechanismus in dieser Verbindungsklasse, die eine Voraussetzung für die gezielte Auffindung potenterer Vertreter dieses Typs ist.

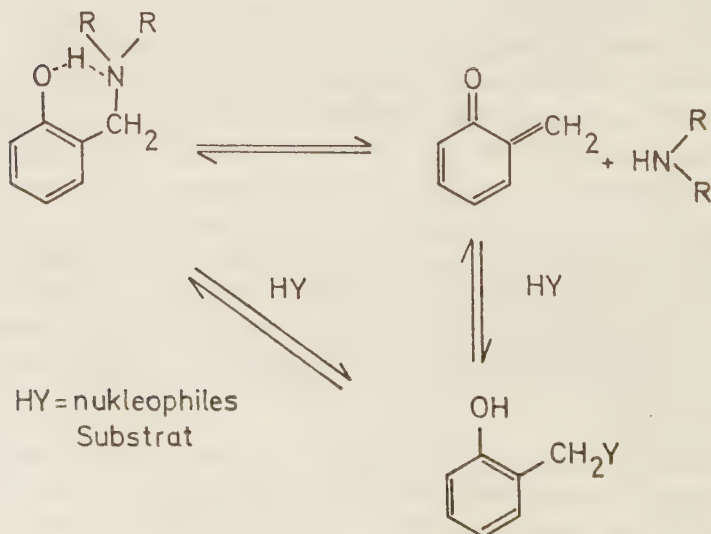
1,2-Diphenyl-äthylendiamine zeigen bei fehlenden östrogenen Nebenwirkungen mammatumورهemmende Eigenschaften; ihre weitere wissenschaftliche Bearbeitung dürfte daher von Interesse sein.

2.3.2. Entwicklung potentieller cytotoxischer Verbindungen mit Diäthylstilböstrol und Hexöstrol als Östrogenrezeptor-affine Carrier

Im Zusammenhang mit der Entwicklung von Cytostatica mit Östrogenrezeptor-affinen Carrierresten wurden in unserem Arbeitskreis 3'- bzw. 3,3'-Di-(aminomethyl)-4,4'-dihydroxy- α,β -diäthylstilbene und 3,4 -Di-(3'-aminomethyl-4'-hydroxyphenyl)-hexane synthetisiert.

Diese Verbindungen enthalten die α -Amino-o-kresol-Struktur, die in zahlreichen biologisch aktiven Verbindungen zu finden ist. Unter anderem wird über antimikrobielle und tumorhemmende Eigenschaften berichtet (siehe dazu F. Schmidt, 3).

Die antimikrobiellen und tumorhemmenden Eigenschaften der α -Amino-o-kresole beruhen vermutlich auf einem ähnlichen Wirkungsmechanismus, wie wir ihn für β -Aminoketone angegeben haben (76). Danach entfalten Keton-Mannich-Basen ihre Wirkung durch Acyläthylierung nukleophiler biologischer Substrate. Phenol-Mannich-Basen sind ebenfalls in der Lage, mit nukleophilen Verbindungen (R-SH,



$R-NH_2$) unter Austausch der Aminogruppe zu reagieren (77). Als Mechanismus werden eine Eliminierungs-Additionsreaktion und eine direkte nukleophile Substitution unter Verdrängung der Aminogruppe diskutiert (78).

Nach neueren Untersuchungen, die am Beispiel der Umsetzung von α - und β -Naphthol-Mannich-Basen mit Thiophenolderivaten von Andrisano und Mitarb. (52) durchgeführt wurden, handelt es sich hierbei um eine Eliminierungs-Additionsreaktion (E1cB-Mechanismus).

Reaktionen dieser Art sind bisher nur unter präparativen Bedingungen vorgenommen worden. Die Frage, ob α -Amino-o-kresole ähnlich wie β -Aminoketone auch unter physiologischen Bedingungen mit biologisch wichtigen nukleophilen Substraten reagieren und auf diese Weise cytostatisch wirken, ist ungeklärt.

Umsetzungsversuche mit Cystein bei pH 7,35 und 37°C verliefen negativ (3). Bei β -Aminoketonen wurde von Schönenberger und Mitarb. (76) eine Hemmung der RNA- und DNA-Synthese von Sarkom-180-Zellen in vitro nachgewiesen. Als Angriffspunkte der β -Aminoketone wurden neben Enzymen des Kohlenhydratstoffwechsels solche des Nukleinsäurestoffwechsels (Thymidin-Kinase, DNA-Polymerase, RNA-Polymerase) festgestellt.

In dieser Arbeit war zu klären, ob die 3,4 -Di-(3'-aminomethyl-4'-hydroxy-phenyl)-hexane (Verb.Nr. 4-7) und die 3,3'-Di-(aminomethyl)-4,4'-dihydroxy- α,β -diäthylstilbene (Verb.Nr. 14-17) ähnlich wie β -Aminoketone zu einer Hemmung der RNA- und DNA-Biosynthese befähigt sind. Ferner war zu prüfen, ob durch Aminomethylierung von Stilböstrol und Hexöstrol die Fähigkeit dieser Östrogene zur Bindung an Östrogenrezeptoren erhalten bleibt und ob aus dieser synthetischen Abwandlung unter Verlust der östrogenen Eigenschaften Antiöstrogene resultieren. Entsprechend unserem Testsystem war eine abschließende Beurteilung eventueller cytostatischer rezeptoraffiner Vertreter am DMBA-induzierten Mammatumors der SD-Ratte vorgesehen.

Von den geprüften aminomethylierten Stilböstrolen (Verb.Nr. 14 - 16) und Hexöstrolen (Verb.Nr. 4-7) führten Nr. 14 und 15 bzw. 4 und 6 zu einer ausgeprägten, wenn auch im Vergleich zu 4,4'-DES und 4,4'-HES geringeren Hemmung der DNA- und RNA-Synthese. Die Proteinbiosynthese wurde im gleichen Konzentrationsbereich nicht beeinflusst. Auf Grund der Versuche kann nicht entschieden werden, ob die Hemmung der RNA- und DNA-Synthese dieser vier Verbindungen auf eine Aminomethylierung biologischer Substrate zurückzuführen ist.

Die 3,4 -Di-(3'-aminomethyl-4'-hydroxyphenyl)-hexane (Verb.Nr. 4-7) sind schwache kompetitive Hemmer der Östradiol-Rezeptor-Wechselbeziehung. Die Affinität nimmt in der Reihenfolge der 3'-Substituenten Dimethylaminomethyl > Diäthylaminomethyl > Pyrrolidinomethyl > Piperidinomethyl ab. Die 3,3'-Di-(aminomethyl)-4,4'-dihydroxy- α,β -diäthylstilbene zeigen bei 2×10^{-5} M keine Affinität zum Östrogenrezeptor.

Ihre Monoaminomethyl-Derivate 3-(Dimethylaminomethyl)-4,4'-dihydroxy- α,β -diäthylstilben (Verb.Nr. 11) und 3-(α -Dimethylaminobenzyl)-4,4'-dihydroxy- α,β -diäthylstilben (Verb.Nr. 12) sind hoch rezeptoraffin und hemmen kompetitiv die Östradiol-Rezeptor-Wechselbeziehung.

Der Grund für die erheblich schwächere Rezeptoraffinität der aminomethylierten Hexöstrole im Vergleich zu 4,4'-HES bzw. der Verlust der Bindungsfähigkeit der entsprechenden DES-Derivate dürften in der sterischen Hinderung der für die Rezeptor-Wechselbeziehungen wichtigen phenolischen OH-Gruppen liegen.

Schmidt (3) konnte mit Hilfe der IR-Spektroskopie eine starke innermolekulare Wasserstoffbrücke zwischen phenolischer OH-Gruppe und Dialkylaminomethylgruppe nachweisen. Es ist denkbar, daß aufgrund dieser innermolekularen Wechselbeziehung die Bildung einer Wasserstoffbrücke zum Rezeptor behindert ist. Schmidt (3) stellte jedoch ebenfalls fest, daß der %-Anteil protonierter Base sich in dieser Verbindungsklasse bei pH 7,35 zwischen 93,4 und 99,4 bewegt. Da solche protonierten Basen keine intramolekulare Wasserstoffbrückenbindung mit der phenolischen OH-Gruppe aufbauen

$R-NH_2$) unter Austausch der Aminogruppe zu reagieren (77). Als Mechanismus werden eine Eliminierungs-Additionsreaktion und eine direkte nukleophile Substitution unter Verdrängung der Aminogruppe diskutiert (78).

Nach neueren Untersuchungen, die am Beispiel der Umsetzung von α - und β -Naphthol-Mannich-Basen mit Thiophenolderivaten von Andrisano und Mitarb. (52) durchgeführt wurden, handelt es sich hierbei um eine Eliminierungs-Additionsreaktion (E1cB-Mechanismus).

Reaktionen dieser Art sind bisher nur unter präparativen Bedingungen vorgenommen worden. Die Frage, ob α -Amino-o-kresole ähnlich wie β -Aminoketone auch unter physiologischen Bedingungen mit biologisch wichtigen nukleophilen Substraten reagieren und auf diese Weise cytostatisch wirken, ist ungeklärt.

Umsetzungsversuche mit Cystein bei pH 7,35 und 37°C verliefen negativ (3). Bei β -Aminoketonen wurde von Schönenberger und Mitarb. (76) eine Hemmung der RNA- und DNA-Synthese von Sarkom-180-Zellen in vitro nachgewiesen. Als Angriffspunkte der β -Aminoketone wurden neben Enzymen des Kohlenhydratstoffwechsels solche des Nukleinsäurestoffwechsels (Thymin-Kinase, DNA-Polymerase, RNA-Polymerase) festgestellt.

In dieser Arbeit war zu klären, ob die 3,4 -Di-(3'-aminomethyl-4'-hydroxy-phenyl)-hexane (Verb.Nr. 4-7) und die 3,3'-Di-(aminomethyl)-4,4'-dihydroxy- α,β -diäthylstilbene (Verb.Nr. 14-17) ähnlich wie β -Aminoketone zu einer Hemmung der RNA- und DNA-Biosynthese befähigt sind. Ferner war zu prüfen, ob durch Aminomethylierung von Stilböstrol und Hexöstrol die Fähigkeit dieser Östrogene zur Bindung an Östrogenrezeptoren erhalten bleibt und ob aus dieser synthetischen Abwandlung unter Verlust der östrogenen Eigenschaften Antiöstrogene resultieren. Entsprechend unserem Testsystem war eine abschließende Beurteilung eventueller cytostatischer rezeptoraffiner Vertreter am DMBA-induzierten Mammatumors der SD-Ratte vorgesehen.

Von den geprüften aminomethylierten Stilböstrolen (Verb.Nr. 14 - 16) und Hexöstrolen (Verb.Nr. 4-7) führten Nr. 14 und 15 bzw. 4 und 6 zu einer ausgeprägten, wenn auch im Vergleich zu 4,4'-DES und 4,4'-HES geringeren Hemmung der DNA- und RNA-Synthese. Die Proteinbiosynthese wurde im gleichen Konzentrationsbereich nicht beeinflusst. Auf Grund der Versuche kann nicht entschieden werden, ob die Hemmung der RNA- und DNA-Synthese dieser vier Verbindungen auf eine Aminomethylierung biologischer Substrate zurückzuführen ist.

Die 3,4 -Di-(3'-aminomethyl-4'-hydroxyphenyl)-hexane (Verb.Nr. 4-7) sind schwache kompetitive Hemmer der Östradiol-Rezeptor-Wechselbeziehung. Die Affinität nimmt in der Reihenfolge der 3'-Substituenten Dimethylaminomethyl > Diäthylaminomethyl > Pyrrolidinomethyl > Piperidinomethyl ab. Die 3,3'-Di-(aminomethyl)-4,4'-dihydroxy- α,β -diäthylstilbene zeigen bei 2×10^{-5} M keine Affinität zum Östrogenrezeptor.

Ihre Monoaminomethyl-Derivate 3-(Dimethylaminomethyl)-4,4'-dihydroxy- α,β -diäthylstilben (Verb.Nr. 11) und 3-(α -Dimethylaminobenzyl)-4,4'-dihydroxy- α,β -diäthylstilben (Verb.Nr. 12) sind hoch rezeptoraffin und hemmen kompetitiv die Östradiol-Rezeptor-Wechselbeziehung.

Der Grund für die erheblich schwächere Rezeptoraffinität der aminomethylierten Hexöstrole im Vergleich zu 4,4'-HES bzw. der Verlust der Bindungsfähigkeit der entsprechenden DES-Derivate dürften in der sterischen Hinderung der für die Rezeptor-Wechselbeziehungen wichtigen phenolischen OH-Gruppen liegen. Schmidt (3) konnte mit Hilfe der IR-Spektroskopie eine starke innermolekulare Wasserstoffbrücke zwischen phenolischer OH-Gruppe und Dialkylaminomethylgruppe nachweisen. Es ist denkbar, daß aufgrund dieser innermolekularen Wechselbeziehung die Bildung einer Wasserstoffbrücke zum Rezeptor behindert ist. Schmidt (3) stellte jedoch ebenfalls fest, daß der %-Anteil protonierter Base sich in dieser Verbindungsklasse bei pH 7,35 zwischen 93,4 und 99,4 bewegt. Da solche protonierten Basen keine intramolekulare Wasserstoffbrückenbindung mit der phenolischen OH-Gruppe aufbauen

können, ist die Abnahme der Rezeptoraffinität bei homologen 3,4-Di-(3'-aminomethyl-4'-hydroxyphenyl)-hexanen nur mit einer Zunahme der sterischen Behinderung der phenolischen OH-Gruppe durch die sperrigen Substituenten in der Nachbargruppe erklärbar. Auch Hüttenrauch (79) beschreibt den störenden Einfluß eines zur 3-OH-Gruppe benachbarten CH_3 -Restes im Östradiolmolekül auf die biologische Aktivität.

Die Tatsache, daß aminomethylierte Hexöstrole eine abgeschwächte östrogene Wirkung, aminomethylierte Stilböstrole aber einen völligen Wirkungsverlust aufweisen, ist mit der gleichen Theorie erklärbar, wie wir sie bei den isomeren Hexöstrolen und Stilböstrolen diskutierten.

Die Hexöstrolderivate können auf Grund der freien Drehbarkeit in der Hexankette die für die Anpassung zum Rezeptor optimale Konformation ausbilden und die beiden OH-Gruppen in eine für die Bildung von Wasserstoffbrücken günstige Position bringen.

Die hohen Affinitäten der Monoaminomethyl-Verbindungen 11 und 12 (keine Rezeptorbindung bei den Verb.Nr. 13 bis 17) zeigen, daß bereits ein nichtsubstituierter Phenylrest im 4,4'-DES-Molekül für eine Bindung an den Östrogenrezeptor ausreicht. In die gleiche Richtung weisen Ergebnisse mit rezeptoraffinen 16 α -heterosubstituierten (Br , N_3 , NH_2 , NHCOCH_3) Östradiolen (80), sowie die hohe Affinität von 17 β -Desoxyöstradiol ($K_i = 3 \times 10^{-8} \text{ M}$) (55).

Die Ergebnisse mit den monosubstituierten Stilböstrolen lassen diese Verbindungen als geeignete Carriermoleküle für cytotoxische Substanzen (z.B. Stickstofflost) erscheinen. Diese Moleküle haben auf Grund ihrer Rezeptoraffinität die Möglichkeit, in den Zellkern der 'target'-Zelle zu gelangen.

Die aminomethylierten Diäthylstilböstrole (Verb.Nr. 13-17) zeigen - entsprechend ihrer fehlenden Affinität zum Östrogenrezeptor - weder uterotrope, noch kolpotrope Eigenschaften. Die Substanzen werden in vivo nicht zu östrogenen Metaboliten transformiert.

Die Prüfung von 3,4-Di-(3'-aminomethyl-4'-hydroxyphenyl)-hexanen (Verb.Nr. 4-6) auf Parallelität, sowie die Steigungen der Dosis-Wirkungsgeraden (mittlere Regression) ergaben einen mit 4,4'-HES identischen Wirkungstyp; sie sind echte Östrogene. Sie zeigen entsprechend ihrer relativ geringen Rezeptoraffinität erst in hohen Konzentrationen eine uterotrope und kolpotrope Wirkung. Ihre maximalen Effekte auf das Uteruswachstum und das Vaginalepithel konnten auf Grund der Toxizität der Substanzen nicht untersucht werden. Die Östrogene Wirkung der Substanzen nimmt (analog der Rezeptoraffinität in vitro) mit zunehmender Größe der Substituenten ab.

Die von Ponsold (81) beschriebene Umwandlung des echten Östrogens Östradiol-3-methyläther in ein "impeded" Östrogen durch einen zusätzlichen Methylaminomethylsubstituenten in 17 α -Stellung konnte im Falle der 3,4-Di-(3'-aminomethyl-4'-hydroxyphenyl)-hexane nicht erreicht werden. Die Wirkung des 4,4'-HES wurde abgeschwächt, der Wirktyp jedoch nicht verändert.

Unsere Befunde sind mit denen von Schmähl (82) an Dihydroxystilbenen zu vergleichen, bei denen durch eine 3,3'-Methylgruppe die östrogene Wirkung stark abgeschwächt, jedoch der Wirktyp der Substanzen nicht verändert wird.

Derselbe wirkungsabschwächende Effekt durch eine CH₃-Gruppe ist am 17 β -Östradiol zu beobachten, wo durch eine Substitution von CH₃ am C₂ bzw. C₄ die biologische Aktivität des Moleküls auf 0,0005 (E₂ = 1) absinkt (79). Dieser Aktivitätsverlust stimmt mit dem bei unseren aminomethylierten Hexöstrolen bzw. Stilböstrolen beobachteten überein.

Die aminomethylierten Stilböstrole (Verb.Nr. 14 und 15) waren auf Grund ihrer cytotoxischen Eigenschaften trotz fehlender Rezeptoraffinität für eine weitere Prüfung an hormonunabhängigen Tumoren von Interesse. Sie wurden in unserem Arbeitskreis von Schmidt (3) am Yoshida-Sarkom der Ratte und am Sarkom-180 der Maus geprüft. Es wurde keine nennenswerte Tumorchemmung festgestellt.

Die aminomethylierten Hexöstrole (Verb.Nr. 4 und 6), die sich durch cytotoxische und schwache östrogene Eigenschaften und durch eine Affinität zum Östrogenrezeptor auszeichnen, waren für eine weitere Prüfung an hormonabhängigen Mammatumoren von Interesse. Diese Verbindungen könnten auf Grund ihrer Rezeptoraffinität über eine Anreicherung in der Tumorzelle ihre toxische Wirkung selektiv zur Geltung bringen und durch Erhöhung des Proliferationspools einen erheblich höheren Anteil der Tumorzellen treffen, als es bei der Anwendung der üblichen Cytostatica möglich ist (83).

An den hormonunabhängigen Transplantationstumoren Yoshida-Sarkom und Sarkom-180 waren die aminomethylierten Hexöstrole (Verb.Nr. 4 und 6) unwirksam. Eine Prüfung am DMBA-induzierten hormonabhängigen Mammacarcinom der SD-Ratte steht noch aus. Eine Testung des cytotoxischen, nicht rezeptoraffinen 3,3'-Di-(dimethylaminomethyl)-4,4'-dihydroxy- α,β -diäthylstilbens am Benzidin-induzierten hormonabhängigen Mammacarcinom der Ratte, die von Dr. Steinhoff (Bayer AG, Leverkusen) durchgeführt wurde, erbrachte bei einer Behandlung über 40 Tage und einer Dosis von 100 mg/kg p.o. 5 x pro Woche ein T/C von 0,37.

Eine Verbindung, die aus dem Carrier 4,4'-DES und zwei Carbamatlostgruppierungen als cytocide Gruppen, die esterartig an die beiden phenolischen OH-Gruppen gebunden sind, besteht, wurde beim Mammacarcinom des Menschen als wirksam beschrieben (84). Diese Verbindung könnte ebenso wie die vorstehend beschriebenen aminomethylierten Hexöstrole durch Anreicherung in den hormonabhängigen Tumorzellen und durch Triggern latenter Tumorzellen in den Proliferationspool eine selektive mammatumورهemmende Wirkung entfalten.

Die Prüfung von Verb.Nr. 20 auf Rezeptoraffinität verlief negativ. Dieses Ergebnis stimmt mit den Befunden von Powell-Jones u. Mitarb. (53) überein, die die gleiche Verbindung in vitro an Cytosolen aus DMBA-Tumor der SD-Ratte und an Schnitten von menschlichen Mammacarcinomen auf eine Anreicherung testeten. In die gleiche Richtung - Verlust der Rezeptorbindungsfähigkeit bei Estern von östrogenen Carrier-Gruppen mit sperrigen cytotoxischen Resten - weisen die Er-

gebnisse von Shepherd, Huff und McGuire (54) mit Östradiol-Mustard (EM), einem Diester aus Östradiol und N-Bis-(β -chlor-äthyl)-4'-amino-phenylessigsäure. Diese Versuche wurden an Rattenuterus-Cytosolen und an Gewebeproben des menschlichen Mammatumors durchgeführt. Shepherd und Mitarb. (54) beobachteten in vivo nach EM-Gabe eine Wanderung des Östrogenrezeptors in den Zellkern. Die lange Zeit zwischen EM-Gabe und Kernwanderung im Vergleich zu den Verhältnissen bei alleiniger Östradiolgabe läßt auf eine Hydrolyse einer bzw. beider Esterbindungen schließen, so daß der zu beobachtende Effekt auch allein dem freigewordenen Östradiol zugeschrieben werden könnte. Die von Shepherd und Mitarb. (54) beschriebenen Befunde lassen eine Anreicherung von alkylierenden Agentien, die als Ester mit den Carrier-Molekülen verknüpft sind, im Kern der 'target'-Zelle fraglich erscheinen.

Anscheinend beruht die fehlende Rezeptoraffinität des Lostcarbamats (Verb.Nr. 20) auf der $R_2N-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}-O$ -Gruppierung, die nicht mehr zu einer Wasserstoffbrückenbeziehung zum Rezeptor befähigt ist. Bei den entsprechenden Estern des 4,4'-DES mit Carbaminsäure und N-Methylcarbaminsäure, die noch über N-ständige, zur Brückenbeziehung befähigte H-Atome verfügen, fanden wir eine mit 4,4'-DES vergleichbare (Verb.Nr. 18) bzw. eine leicht verringerte (Verb.Nr. 19) Rezeptoraffinität. Beide Verbindungen hemmen kompetitiv die Östradiol-Rezeptor-Wechselbeziehung.

Auch die Verb.Nr. 18, 19 dürften als Cytostatica mit Östrogenrezeptor-affinen Carrierresten von Interesse sein, da die Carbaminsäureestergruppierung in verschiedenen Antitumorverbindungen, z.B. Aethylurethan, enthalten ist. Eine weitere Prüfung dieser Stoffe ist vorgesehen.

2.3.3. Entwicklung potentieller antiinflammatorischer, mammatumorhemmender 4,5-Di-(4'-hydroxyphenyl)-imidazole
(Verb.Nr. 70-73)

Die Auffindung von Verbindungen mit einer spezifischen Wirkung am DMBA-induzierten, hormonabhängigen Mammatumor der SD-Ratte in der Klasse der 1,2-Diphenyl-äthylendiamine (85, 83) veranlaßte uns zur pharmakologischen Prüfung der 4,5-Diphenylimidazole. Sie besitzen nach Untersuchungen von Lombardino und Wiseman (86, 87) eine ausgeprägte antiinflammatorische Wirkung (Verb.Nr. 70 mit Phenylbutazon vergleichbar). Verbindungen, die neben antiinflammatorischen auch antiöstrogene Eigenschaften aufweisen, sind als Therapeutica für die Behandlung des disseminierten Mammacarcinoms von Interesse.

Antiphlogistica mit antiöstrogenen Eigenschaften können ihre antiinflammatorische Wirkung durch Anreicherung in den Knochenmetastasen verstärkt zur Geltung bringen und daneben direkte tumorhemmende Effekte entfalten. Eine Antitumorwirkung wurde für die Antiphlogistica Acetylsalicylsäure und Indomethacin von Powles und Mitarb. (88) nachgewiesen. Sie verhindern in vitro die durch Mammacarcinome oder Walker-256-Carcinosarkome verursachte Freisetzung von Ca^{2+} aus Knochengeweben und in vivo die Bildung osteolytischer Knochentumoren, sowie das Auftreten von Hypercalcämie nach intraaortaler Injektion von Walker-256-Carcinosarkomzellen. Als Wirkungsursache werden diskutiert:

1. eine Hemmung der Prostaglandinsynthese (Prostaglandine verursachen Osteolyse (89));

2. eine Behinderung der Freisetzung osteolytischer lysosomaler Enzyme aus Tumorzellen oder stimulierten Knochenzellen, welche die Anreicherung von Knochentumoren vermutlich erleichtern.

Unphysiologische Ca^{++} -Mobilisierung (Hypercalcämie) und gleichzeitiges Auftreten von Knochenmetastasen sind eine häufige Begleiterscheinung bei fortgeschrittenem Mammacarcinom.

Durch Antiphlogistica wird nur die Entwicklung von Knochenmetastasen, jedoch nicht die von Weichteilmetastasen beeinflusst.

Die Prüfung der 4,5-Di-(4'-hydroxyphenyl)-imidazole (Verb.Nr. 70-73) in unserem Testsystem ergab eine deutliche Rezeptoraffinität, die bei in 2-Stellung durch Phenyl substituierten Imidazolen (Verb.Nr. 71) am größten war. Der Methyläther (Verb. Nr. 70) war nicht affin, eine Bioaktivierung dieser Verbindung ist jedoch zu erwarten. Da die Sauerstoffatome der beiden phenolischen OH-Gruppen in Verb.Nr. 71 nicht den als optimal erkannten Abstand von 10,95 bzw. 12,55 Å besitzen, sondern einen merklich kleineren Wert aufweisen, nehmen wir an, daß nur eine dieser Gruppen bei der Rezeptorbindung beteiligt ist. Nach unseren eigenen Untersuchungen und den Befunden von Geynet (55) genügt bereits eine phenolische OH-Gruppe für die Bindung des Inhibitors an Östrogenrezeptoren. Die anderen aromatischen Reste verstärken durch hydrophobe Wechselwirkung die Rezeptorbindung. Die Bedeutung des 2-ständigen Phenylrestes in der wirksamsten Verb.Nr. 71 wird durch die starke Abnahme der Rezeptoraffinität beim Ersatz durch eine CH₃-Gruppe (Verb.Nr. 73) oder durch einen Wasserstoff (Verb.Nr. 72) ersichtlich.

Trotz der deutlichen Affinität der geprüften Verbindungen zum Östrogenrezeptor zeigte keine der Verbindungen in vivo eine östrogene Wirkung, auch nicht der Methyläther von 2-Phenyl-4,5-di-(4'-hydroxyphenyl)-imidazol (Verb.Nr. 70). Da auch im Anti-östrogenitätstest der rezeptoraffinsten Verbindung keine Wirkung feststellbar war, wurde die Reversibilität des Inhibitor-Rezeptorkomplexes untersucht. Verb.Nr. 71 wurde in diesem Experiment durch ³H-Östradiol vollständig vom Rezeptor verdrängt. Dieser Befund erklärt die fehlende östrogene und antiöstrogene Wirkung von Verb.Nr. 71.

Neben dem nicht maximalen Abstand der beiden phenolischen OH-Gruppen sind an den fehlenden in vivo-Wirkungen auch die im Zentrum des Moleküls befindlichen Stickstoffatome (Imidazolring) beteiligt, die durch ihre Tendenz zur Ausbildung von Hydrathüllen die hydrophobe Wechselbeziehung des Moleküls zum lipophilen Areal

des Östrogenrezeptors behindern. Auch bei den 1,2-Diphenyl-äthylendiaminen (4,5-Imidazole enthalten dieses Strukturelement) konnte eine starke Reduktion der Rezeptoraffinität und eine hohe Reversibilität des Komplexes beobachtet werden. Bei dieser Stoffklasse treten ebenfalls weder östrogene noch antiöstrogene Wirkungen in in vivo-Versuchen auf.

Im Gegensatz zu 17β -Desoxyöstradiol, einer Substanz mit nur einer phenolischen OH-Gruppe, aber ausgeprägten, wenn auch gegenüber Östradiol verringerten rezeptoraffinen (55) und östrogenen Eigenschaften (46), scheint bei Verb.Nr. 71 die aus der hydrophoben Wechselbeziehung resultierende freie Bindungsenergie für die Stabilisierung des Rezeptor-Komplexes nicht auszureichen. Neben einer stabileren Rezeptorbindung durch eine vergleichsweise stärkere hydrophobe Wechselbeziehung könnte die Bildung von Ringhydroxylierungsprodukten in vivo (zur Metabolisierung von Östradiol siehe Breuer (58)) die Ursache der östrogenen Wirkung von 17β -Desoxy-Östradiol sein.

Die negativen Auswirkungen eines Austausches von Kohlenstoffatomen durch Stickstoff wurden auch bei 4,4'-Dihydroxystilben beobachtet.

Kolpotrope Effekte wurden bei ovariectomierten Ratten durch eine Dosis von 70 mg/kg (ED_{50}) 4,4'-Dihydroxystilben ausgelöst (82). Der Ersatz von CH durch N in der $-C=C-$ Gruppe führte zu einem Abfall der östrogenen Wirkung; die neue Verbindung 4,4'-Dihydroxybenzalanilin zeigte eine ED_{50} von 5000 mg/kg.

Trotz der negativen Ergebnisse der Prüfung auf östrogene oder antiöstrogene Wirkung wurde Verb.Nr. 71 weiter auf Antitumorwirkung geprüft. Verb.Nr. 71 zeigte eine ausgeprägte Hemmung der DNA- und RNA-Synthese bei Walker-256-Carcinosarkomzellen in vitro. Die Werte für 4,4'-DES und 4,4'-HES liegen um etwa eine Größenordnung über diesem Wert. Während bei 4,4'-HES und 4,4'-DES die ED_{50} -Werte von RNA-Synthesehemmung und cytocider Wirkung sich kaum unterscheiden, beobachtet man bei Verb.Nr. 71 eine ED_{50} , die bezüglich der cytociden Wirkung etwa zwei Größenordnungen über dem ED_{50} -Wert der RNA- und DNA-Synthesehemmung liegt.

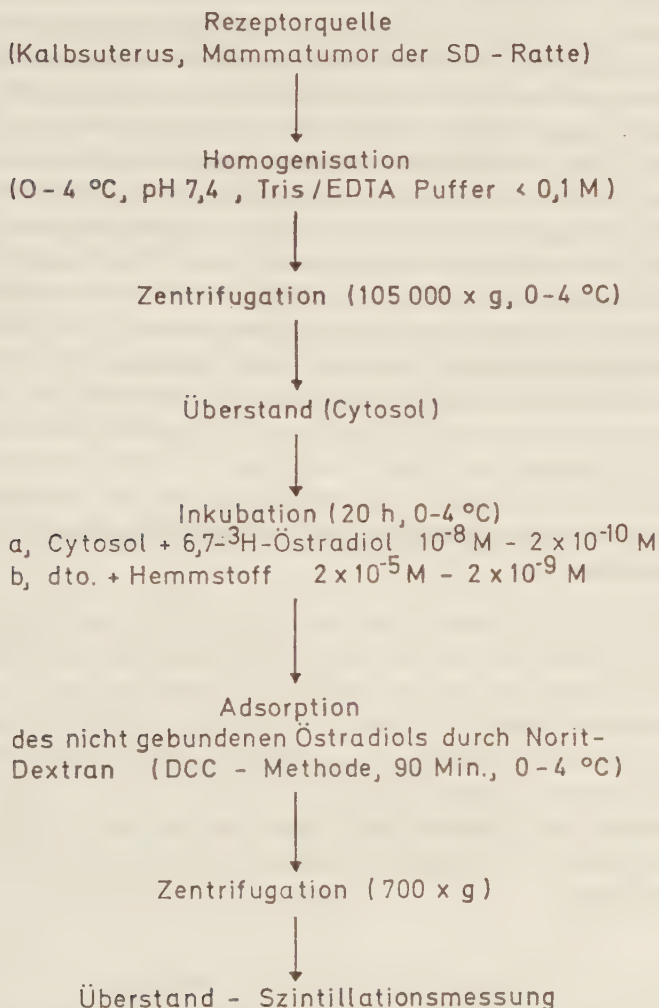
In vivo konnte beim Ehrlichschen Aszitestumor der Maus eine geringe Verlängerung der mittleren Lebensdauer durch Verb.Nr. 71 festgestellt werden (8).

Auch beim DMBA-induzierten hormonabhängigen Mammatumor der SD-Ratte beobachteten wir eine nicht signifikante Verzögerung des Tumorwachstums unter Verb.Nr. 71 ($T/C = 0,67$).

3. Experimenteller Teil

3.1. Methodik der Untersuchungen am Östrogenrezeptor in vitro

3.1.1. Schema des Testverfahrens



3.1.2. Herstellung des Cytosols

Als Rezeptorquelle dient Kalbsuterus. Der Uterus wird sofort nach dem Töten der Tiere entnommen und bis zur Aufarbeitung am gleichen Tag in eiskalter 0,9 %iger NaCl-Lösung aufbewahrt. Alle Arbeiten werden bei 0 - 4°C mit Tris-Puffer (0,01 M TRIS/HCl, 0,001 M EDTA, 0,003 M NaN_3 , pH: 7,5⁺) ausgeführt. Die Uteri werden von Fett, Parametrium und Perimetrium befreit. Durch Waschen mit 0,9 %iger NaCl-Lösung werden Blut und Schleimreste entfernt. Die noch aus Myometrium und Endometrium bestehenden Uterushörner werden der Länge nach aufgeschnitten und in ca. 9 cm² große Stückchen geteilt. Jedes dieser Teilchen wird mit 1 ml Trispuffer versetzt und in einer Petrischale mit einer Schere vorzerkleinert. Anschließend wird in einem Glas in Glas Homogenisator (Potter S, Fa. Braun, Melsungen) homogenisiert. Um die Temperatur des Präparats bei 0 - 4°C zu halten, wird jeweils nach 30 s der Arbeitsprozeß 1 Minute unterbrochen. Der so gewonnene Rohextrakt wird bei 105 000 x g eine Stunde zentrifugiert (Beckman L - 2 Ultrazentrifuge). Der klare Überstand (Cytosol) wird ohne die oben schwimmende Fettschicht mit einer Pasteurpipette entnommen. Der Proteingehalt des Zentrifugats wird nach der Methode von Lowry (91) bestimmt. Er beträgt ca. 20 mg Protein pro ml Cytosol. Als Proteinstandard dient Albumin aus Rinderserum. Für die weiteren Untersuchungen wird das Cytosol auf einen Gehalt von 5 mg Protein pro ml eingestellt.

Das Cytosol wird ohne merklichen Verlust der Bindungsfähigkeit bei 0 - 4°C 7 Tage lang aufbewahrt. Nach dem aufgeführten Verfahren wurden auch aus Ratten- und Kaninchenuterus sowie aus DMBA-induzierten Mammacarcinomen der SD-Ratte östrogenbindende Cytosole gewonnen. Mammatumoren sind häufig mit 'sex steroid binding plasma protein' (Testosteron-Östradiol-bindendes Globulin, TeBG), welches die K_d -Werte verfälscht, kontaminiert. Es läßt sich durch mehrmaliges Auswaschen der zerkleinerten Gewebeteile weitgehend entfernen.

⁺ TRIS: Tris(hydroxymethyl)aminomethan; EDTA: Aethylendiamintetraessigsäure; NaN_3 : Natriumazid.

Der im Cytosol enthaltene, cytoplasmatische Östrogenrezeptor ist nach Puca und Mitarb. (92) ein bei 8,6 S sedimentierendes Protein, das in vitro nur bei Ionenstärken $< 0,1$ M und bei Verwendung von EDTA-haltigem Tris-Puffer (Komplexierung von endogenem Ca^{2+}) haltbar ist. Es ist ein Dimeres des in vivo (Ionenstärken $> 0,1$ M) vorkommenden cytoplasmatischen 5,3 S-Rezeptors.

3.1.3. Kohleadsorptionstechnik (93)

Die Kohleadsorptionstechnik eignet sich zur Bestimmung der Hemmstoff-Rezeptorkonstanten K_1 . Da in der Regel markierte Hemmstoffe nicht zur Verfügung stehen, wird zu diesem Zweck eine indirekte Bestimmungsmethode benutzt. Dabei vergleicht man die durch die Prüfsubstanz reduzierte Rezeptor-Wechselbeziehung von ^3H -Östradiol mit den Ergebnissen eines Hemmstoff-freien Kontrollversuchs. Für die Entfernung des nicht gebundenen ^3H -Östradiols wird Aktivkohle verwendet, die unter den gewählten Versuchsbedingungen zu keiner merklichen Dissoziation des ^3H -Östradiol-Rezeptor-Komplexes führt. Das rezeptorgebundene ^3H -Östradiol wird durch Messung im Szintillationszähler bestimmt.

3.1.3.1. Zusammensetzung der Kohlesuspension

2 % Aktivkohle (Norit A, Teilchengröße 4 - 7 μm)
 0,02 % Dextran (MG: 60 000 - 90 000)
 100 ml TRIS/EDTA Puffer pH 7,5.

3.1.3.2. Herstellung der Kohlesuspension

Das Dextran wird im TRIS-Puffer gelöst und die Kohle mit kleinen Lösungsportionen in einer Reibschale angerieben.

3.1.4. Versuchsaufbau zur Bestimmung der Rezeptoraffinität

Die Bestimmung der Dissoziationskonstanten des Östradiol-Rezeptor-Komplexes und des Hemmstoff-Rezeptor-Komplexes werden mit folgenden Inkubationsansätzen durchgeführt:

3.1.4.1.

- a) 0,1 ml ^3H -Östradiol (Verdünnung 1-7)*
- b) 0,1 ml TRIS-EDTA-Puffer pH 7,5
- c) 0,1 ml Cytosol

3.1.4.2.

- a) 0,1 ml ^3H -Östradiol (Verdünnung 1-7)*
- b) 0,1 ml Hemmstoff x M (10^{-4} - 10^{-9} M)
- c) 0,1 ml Cytosol

3.1.4.3.

- a) 0,1 ml ^3H -Östradiol (Verdünnung 1-7)*
- b) 0,1 ml Östradiol 10^{-4} M (nicht markiert)**
- c) 0,1 ml Cytosol

3.1.4.4.

- a) 0,1 ml ^3H -Östradiol (Verdünnung 1-7)*
- b) 0,2 ml TRIS/EDTA-Puffer pH 7,5

* Ausgangsmolarität der ^3H -Östradiol-Verdünnungen:			
Verdünnung 1	= 5×10^{-8} M	Verdünnung 5	= 5×10^{-9} M
" 2	= 4×10^{-8} M	" 6	= 2×10^{-9} M
" 3	= 2×10^{-8} M	" 7	= 1×10^{-9} M
" 4	= 1×10^{-8} M		

** Bei Cytosolen aus dem DMBA-induzierten Mammatumors der SD-Ratte wird statt 0,1 ml Östradiol 10^{-4} M, 0,1 ml Diäthylstilböstrol 10^{-4} M verwendet.

Die Bestandteile der Inkubationsansätze 3.1.4.1. bis 3.1.4.4. werden in der angegebenen Reihenfolge (a - c) mittels Eppendorfpipetten in 1,5 ml-Nethelerreaktionsgefäße gebracht, auf einem Whirlmix gemischt und bei 0 bis 4°C 20 Stunden inkubiert. Durch Zugabe von 0,2 ml Kohlesuspension wird die Reaktion gestoppt. Die Kohleinkubation dauert bei 0 bis 4°C 1,5 Stunden. Die Molarität der ^3H -Östradiol-Verdünnungen sowie Temperatur und Dauer der Inkubation entsprechen den Empfehlungen der EORTC - Breast Cancer Cooperative Group (94). Zur jeweiligen K_d - bzw. K_i -Bestimmung werden bei den Inkubationsansätzen 3.1.4.1. und 3.1.4.2. für jede ^3H -Östradiol-Verdünnung 6 Werte bestimmt, bei den Inkubationsansätzen 3.1.4.3. und 3.1.4.4. lediglich 3 Werte. Anschließend wird die Kohle 10 Minuten bei 3000 U/min abzentrifugiert, 0,1 ml des Überstandes werden in ein Polyäthylenfläschchen pipettiert, mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt und das Rezeptor-gebundene ^3H -Östradiol im Beckman-Szintillationszähler LS 133 bestimmt.

3.1.5. Berechnung der Dissoziationskonstanten $K_d^{+)}$ und $K_i^{+)}$

Hormon-Rezeptorsysteme gleichen in ihrer Reaktionskinetik den Enzym-Substratsystemen (95). Zur Berechnung von Konstanten der Hormon-Rezeptor-Wechselbeziehung zieht man deshalb die Auswertungsverfahren der Enzymkinetik heran. Im vorliegenden Fall werden die Ergebnisse mit Hilfe des Lineweaver-Burk-Diagramms (96) ausgewertet. Anstelle der reziproken Gesamtsubstratkonzentration (in der Enzymkinetik) verwendet man die reziproken Werte der freien, nicht gebundenen ^3H -Östradiolkonzentration (95).

Nach Lineweaver-Burk gilt:

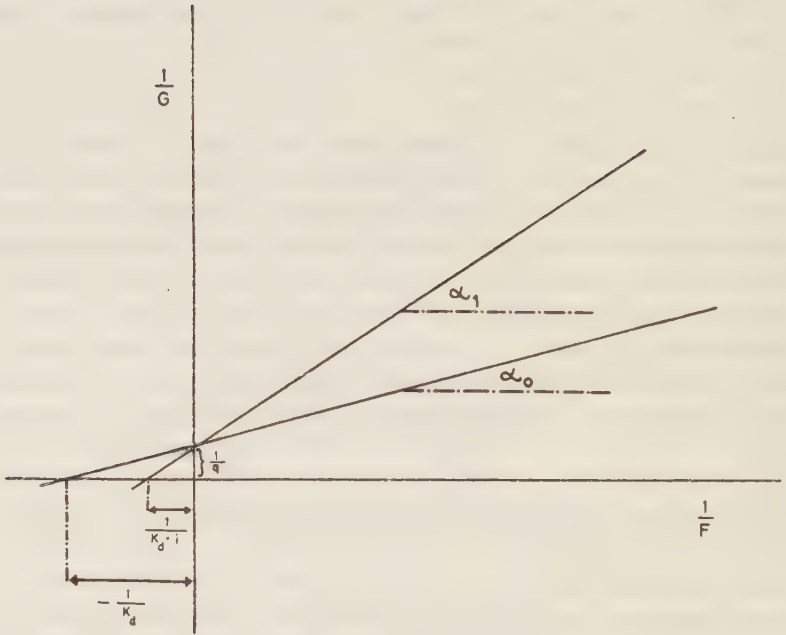
a) bei nicht gehemmter Reaktion:
$$\frac{1}{G} = \frac{K_d}{q} \cdot \frac{1}{F} + \frac{1}{q}$$

b) bei kompetitiver Hemmung:
$$\frac{1}{G} = \frac{K_d \cdot i}{q} \cdot \frac{1}{F} + \frac{1}{q}$$

$^{+)}$ K_d = Dissoziationskonstante des Östradiol-Rezeptor-Komplexes

K_i = Dissoziationskonstante des Inhibitor-Rezeptor-Komplexes

wobei: $i = 1 + \frac{I}{K_i}$



α_0 : Steigung der Regressionsgeraden der Östradiol-Rezeptor-Wechselbeziehung

$$(\text{tg } \alpha_0 = \frac{K_d}{q})$$

α_1 : Steigung der Regressionsgeraden der gehemmten Östradiol-Rezeptor-Wechselbeziehung

$$(\text{tg } \alpha_1 = \frac{K_d \cdot i}{q})$$

K_d : Dissoziationskonstante des Östradiol-Rezeptor-Komplexes

K_i : Dissoziationskonstante des Inhibitor-Rezeptor-Komplexes

I : Molare Konzentration des Inhibitors

G : Molare Konzentration des rezeptorgebundenen ^3H -Östradiols

F : Molare Konzentration des freien, nicht gebundenen ^3H -Östradiols

q : Konzentration des Rezeptors in Mol gebundenes ^3H -Östradiol pro Proteingehalt des Inkubationsansatzes

$$i: 1 + \frac{I}{K_i}$$

Die Konzentration des rezeptorgebundenen ^3H -Östradiols (G) ergibt sich aus der Differenz der Impulse der Inkubationsansätze 3.1.4.1. und 3.1.4.4. Das in Gegenwart eines Hemmstoffs gebundene ^3H -Östradiol wird aus der Differenz der Impulse der Inkubationsansätze 3.1.4.2. und 3.1.4.4. berechnet. Das freie ^3H -Östradiol (F) entspricht der Differenz aus den Impulsen des Gesamtansatzes abzüglich der Impulse des Rezeptor-gebundenen ^3H -Östradiols. Die Impulse werden entsprechend der spezifischen Aktivität des ^3H -Östradiols und der Zählkreisbeute des Szintillationsmeßgeräts für Tritium in molare Konzentrationen umgerechnet. Cytosole aus nekrotischen DMBA-induzierten Mammatumoren der SD-Ratte enthalten nach Gardner und Wittliff (97) neben spezifisch bindenden Östrogenrezeptoren Serumproteine, wie das Testosteron-Östradiol-bindende Globulin (TeBG). Dieses Protein verursacht bei den Bestimmungen der Rezeptoraffinität und des Rezeptorgehaltes falsche Ergebnisse. Die Prüfung auf eine Kontamination mit TeBG erfolgt mit Diäthylstilb-Östrol, einem synthetischen, nichtsteroiden Östrogen, das keine Affinität zum Testosteron-Östradiol-bindenden Globulin besitzt. Bei mit Serumproteinen kontaminierten Cytosolen aus DMBA-induzierten Mammatumoren errechnet sich das spezifisch gebundene ^3H -Östradiol aus der Differenz der Impulse der Inkubationsansätze 3.1.4.1. und 3.1.4.3. Das in Gegenwart eines Hemmstoffs gebundene ^3H -Östradiol ergibt sich aus der Differenz der Impulse von 3.1.4.2. minus 3.1.4.3.

3.1.6. Auswertung der Versuchsergebnisse

Die Auswertung erfolgt mit einem programmierten Tischcomputer*. Aus den Werten $\frac{1}{F}$ und $\frac{1}{G}$ der gehemmten bzw. der nicht gehemmten Reaktion werden nach der Methode der kleinsten Abweichungsquadrate die Regressionsgeraden der beiden Reaktionen (mit Fehlerrechnung), deren Schnittpunkt und, über die Steigung der beiden Geraden, die Dissoziationskonstanten K_d und K_i mit ihren mittleren absoluten Abweichungen berechnet.

* Für die Programmierung des Rechners sei Herrn Dipl.-Phys. W. Ehm herzlichst gedankt.

3.1.7. Bestimmung der Reversibilität der Inhibitor-Rezeptor-Bindung (39)

0,2 ml des nach Abschnitt 3.1.2. hergestellten Cytosols werden mit 0,2 ml Hemmstofflösung bzw. 0,2 ml TRIS/EDTA-Puffer 60 Minuten bei 0°C vorinkubiert. Eine Hälfte des Ansatzes wird mit 0,1 ml einer 5 nM ^3H -Östradiol-Lösung für weitere 2 Stunden bei 0°C inkubiert. Das rezeptorgebundene ^3H -Östradiol wird mit der Kohle-adsorptionsmethode (siehe Abschnitt 3.1.3.) bestimmt. Die andere Hälfte der Ansätze wird bei 0°C für 20 Minuten mit dextranbeschichteter Aktivkohle inkubiert, um den nicht rezeptorgebundenen Hemmstoff aus dem Reaktionsansatz zu entfernen. Nach dem Abzentrifugieren der Kohle werden die Überstände entnommen, mit 0,1 ml 5 nM ^3H -Östradiol-Lösung versetzt, 60 min bei 0°C, 25 min bei 25°C und 60 min bei 0°C inkubiert. Das gebundene ^3H -Östradiol wird wieder nach Abschnitt 3.1.4. bestimmt. Die in den graphischen Darstellungen angegebenen Ergebnisse sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Versuchen mit je 3 Ansätzen pro Hemmstoffkonzentration.

3.1.8. Überprüfung des in vitro-Rezeptor-Testsystems

Die Überprüfung der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Rezeptorpräparation wurde mit Östron und 17 β -Östradiol durchgeführt, deren Dissoziationskonstanten mit den in der Literatur angegebenen Werten verglichen wurden.

Rodbard (95) fordert bei Hormon-Rezeptor-Studien eine Überprüfung der Affinität von markiertem und unmarkiertem Hormon zum Rezeptor.

Die Versuche ergaben für kaltes Östradiol einen K_d -Wert von $4,0 \times 10^{-10}$ M (Tabelle 36, Abb. 41); die in dieser Arbeit erhaltenen K_d -Werte von tritiummarkiertem Östradiol bewegen sich zwischen $1,5 \times 10^{-10}$ M und $5,6 \times 10^{-10}$ M; die beiden 17 β -Östradiole unterscheiden sich nicht in ihrer Affinität zum Rezeptor.

Die Dissoziationskonstante K_d für Östron beträgt $5,2 \times 10^{-9}$ M (Tabelle 36, Abb. 42).

Geynet u. Mitarb. (55) erhielten für Östradiol K_d -Werte zwischen 2×10^{-10} M und 5×10^{-10} M, sowie für Östron 2×10^{-9} M.

Die unterschiedlichen K_d -Werte für Östron können darauf zurückzuführen sein, daß Geynet (55) mit radioaktivem Östron arbeitete, während die vorliegenden Untersuchungen indirekt mit kaltem Östron durchgeführt wurden.

Tabelle 36: In vitro-Hemmung der Östradiol-Rezeptor-Wechselbeziehung durch Östron und 17 β -Östradiol: Dissoziationskonstanten der Hemmstoff-Rezeptorkomplexe (K_i) und des ^3H -Östradiol-Rezeptorkomplexes (K_d);
 Auswertung: nach Lineweaver-Burk;
 Rezeptorquelle: Kalbsuterus;
 Inkubationsdauer: 20 h bei 0°C.

Verb.Nr.	Östron	17 β -Östradiol
$K_i \pm V^* \quad M$	$5,2 \pm 0,5 \times 10^{-9}$	$4,0 \pm 0,9 \times 10^{-10}$
$K_d \pm V^* \quad M$	$5,0 \pm 0,4 \times 10^{-10}$	$4,7 \pm 0,4 \times 10^{-10}$
Regressionsgerade o. Inhibitor**	$y = 0,48 x + 9,63$	$y = 0,38 x + 8,1$
Korrelationskoeff.	0,998	0,998
Anzahl d. Wertepaare	36	36
Regressionsgerade m. Inhibitor**	$y = 2,30 x + 9,51$	$y = 2,28 x + 8,5$
Korrelationskoeff.	0,994	0,987
Anzahl d. Wertepaare	36	36
Proteingehalt des Cytosols (mg/ml)	4,5	4,5
Rezeptorgehalt (fMol/mg Protein)	1153	1371

*: V = Vertrauensbereich ($\alpha = 0,05$)

** : $x = \frac{1}{\text{freies Östradiol}} \left(\frac{1}{M} \times 10^8 \right)$

$y = \frac{1}{\text{gebundenes Östradiol}} \left(\frac{1}{M} \times 10^8 \right)$

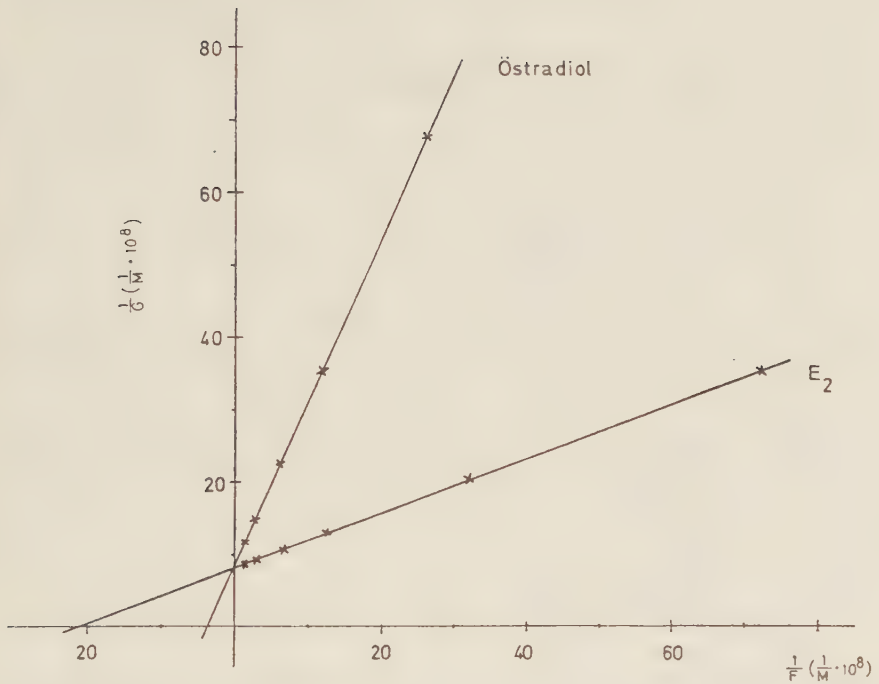


Abb. 41: Kompetitive Hemmung der Östradiol-Rezeptor-Wechselbeziehung durch nicht markiertes Östradiol;

Lineweaver-Burk-System;

Substrat: ^3H -Östradiol (E_2);

Rezeptorquelle: Kalbsuterus;

Inkubationsdauer: 20 h;

Inkubationstemperatur: 0°C;

Inhibitorkonzentration: $2,0 \times 10^{-9}$ Mol/l

Abszisse: $\frac{1}{\text{freies } ^3\text{H-Östradiol}}$

Ordinate: $\frac{1}{\text{gebundenes } ^3\text{H-Östradiol}}$

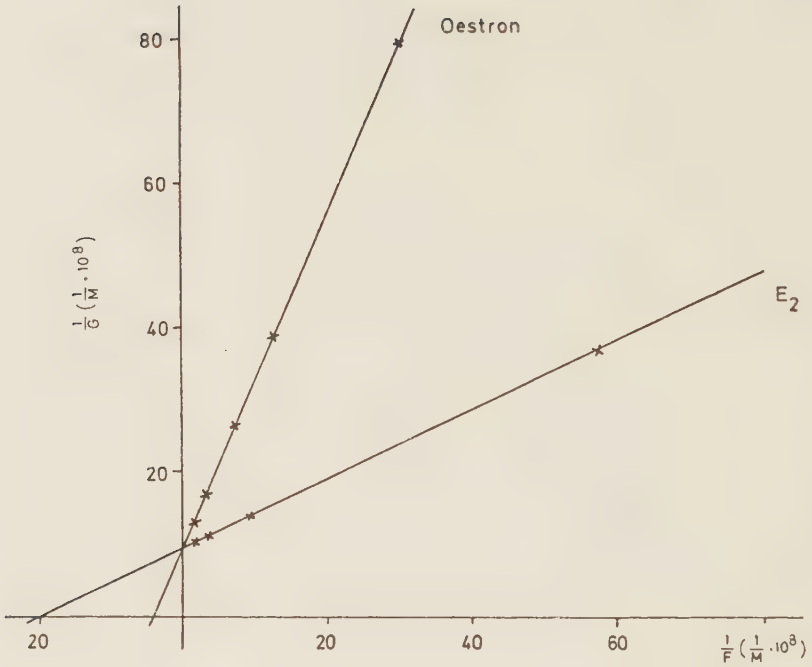


Abb. 42: Kompetitive Hemmung der Östradiol-Rezeptor-Wechselbeziehung durch Östrone;

Lineweaver-Burk-System;

Substrat: ^3H -Östradiol (E₂);

Rezeptorquelle: Kalbsuterus;

Inkubationsdauer: 20 h;

Inkubationstemperatur: 0°C;

InhibitorKonzentration: $2,0 \times 10^{-8}$ Mol/l

Abszisse: $\frac{1}{\text{freies } ^3\text{H-Östradiol}}$

Ordinate: $\frac{1}{\text{gebundenes } ^3\text{H-Östradiol}}$

3.1.9. Einfluß von Aethanol auf die ^3H -Östradiol-Rezeptor-Wechselbeziehung

Da einige der auf Affinität zum Rezeptor getesteten Substanzen in einer Konzentration von 10^{-4} M nicht ohne Alkoholzusatz löslich waren, wurde der Einfluß steigender Konzentrationen EtOH auf die Östradiol-Rezeptor-Wechselbeziehung getestet.

Das Ergebnis (Tabelle 37) zeigt, daß Alkoholkonzentrationen $> 2 \%$ die Dissoziationskonstanten signifikant beeinflussen.

Bei den Vorversuchen wurden deshalb Konzentrationen über 2% vermieden. Substanzen, die sich bei 2% EtOH noch nicht lösten, wurden deshalb in einer 10^{-3} M Kristallsuspension getestet.

Die für die Bestimmung der Dissoziationskonstanten K_i verwendete Alkoholkonzentration war $\leq 0,2 \%$; sie betrug nur bei Verb.Nr. 62a und 62b 1% .

3.1.10. Versuche zur Wahl der geeignetsten Rezeptorquelle

Die in Tabelle 38 aufgeführten Dissoziationskonstanten K_d der Östradiol-Rezeptor-Wechselbeziehung und die Anzahl der Bindungsplätze für die verschiedenen Tier- und Gewebearten stimmen gut mit den Literaturangaben überein (99, 100, 101).

Für das Screening einer großen Anzahl von Substanzen und dem damit verbundenen großen Bedarf an östrogenbindenden Cytosolen hat sich der Kalbsuterus als geeignetste Rezeptorquelle erwiesen.

Die mit Kalbsuterus erhaltenen K_d -Werte für die Östradiol-Rezeptor-Wechselbeziehung sind mit denen anderer Rezeptorquellen vergleichbar. Deshalb lassen sich die Ergebnisse vorliegender Arbeit auf andere 'target'-Organe und andere Spezies übertragen.

Tabelle 37: Einfluß von Aethanol auf die Östradiol-Rezeptor-Wechselbeziehung.

Rezeptorquelle: Kalbsuterus (5 mg Protein/ml);

Auswertung: nach Lineweaver-Burk;

Inkubationsdauer: 20 h bei 0°C.

Aethanolkonzentra- tion d. Inkuba- tionsansatzes %	K_d^*	K_d^{**}	Q^{***}
	M	M	
2	$4,5 \times 10^{-10}$	$3,8 \times 10^{-10}$	1,2
5	$1,7 \times 10^{-9}$	$5,0 \times 10^{-10}$	2,8 ⁺
10	$1,4 \times 10^{-9}$	$5,0 \times 10^{-10}$	2,8 ⁺
20	$6,0 \times 10^{-9}$	$3,1 \times 10^{-10}$	19,4 ⁺

*: K_d mit Aethanol;**: K_d ohne Aethanol; beide K_d -Werte wurden mit demselben Cytosol unter den gleichen Bedingungen bestimmt;***: $\frac{K_d^*}{K_d^{**}} = Q$;+: signifikant ($p < 0,01$).

Tabelle 38: Untersuchungen zur Östradiol-Rezeptor-Wechselbeziehung mit Cytosolen aus DMBA-induzierten Mammatumoren der Ratte und Uteri von Ratte, Kaninchen und Kalb.

Auswertung: nach Lineweaver-Burk;

Inkubationsdauer: 20 h bei 0°C.

Tierart	Gewebe	Alter d. Gewebes (Tage)	K_d (10^{-10} M)	Anzahl der Bindungsplätze (fMol/mg Protein)	Cytosol-Ausbeute aus 1 g Gewebe** (ml)	Tumor- bzw. Organgewicht (g)
SD-Ratte	Tumor	54*	3,7	108	1,3	1,4
	Tumor	100*	3,4	160	1,1	2,1
	Tumor	70*	1,0	149	1,5	0,6
Kaninchen	Uterus	120	1,0	5800	1,6	0,49
SD-Ratte	Uterus	170	5,6	145	1,5	0,15
	Uterus [†]	170	7,7	378	1,2	0,17
	Uterus***	20	7,0	1000	1,1	0,02
Kalb	Uterus	40	5,3	1408	1,6	20
	Uterus	40	4,9	703	1,5	22
	Uterus	40	2,7	980	1,8	18

*: Zeitraum zwischen Entnahme und Induktion des Mammatumors

**: Proteingehalt des Cytosols, eingestellt auf 5 mg/ml

***: juvenile Ratte

†: Uterus entnommen 13 Tage nach Ovariectomie.

3.2. Uterotroper Test, modifiziert nach Rubin und Mitarb. (102)

Für den Versuch werden weibliche, juvenile NMRI-Mäuse (Zucht der Firma Wiga, Sulzfeld, Alter 20 - 23 Tage) mit einem Gewicht von 8 - 12 g verwendet. Die Tiere erhalten Futter (Standarddiät der Fa. Altromin) und Leitungswasser ad libitum. Vor Versuchsbeginn werden die Tiere randomisiert. Pro Dosis werden 7 - 12 Tiere, pro Substanz mindestens 3 Dosen in geometrischer Reihenfolge und 1 Lösungsmittelkontrolle (0-Wert) verwendet. An drei aufeinanderfolgenden Tagen erhalten die Tiere in Abständen von 24 Stunden die Substanz sc.verabreicht. 24 Stunden nach der letzten Injektion werden die Tiere getötet, gewogen, die Uteri entnommen und 12 Stunden in Bouinscher Lösung fixiert. (Bouinsche Lösung: 15 Teile gesättigte, wäßrige Pikrinsäurelösung, 5 Teile 40 %iger Formaldehyd, 1 Teil Eisessig). Nach der Fixierung werden die Bindegewebsreste entfernt und die Uteri in gesättigter, alkoholischer Lithiumchloridlösung solange gewaschen, bis sich die Waschflüssigkeit nicht mehr gelb färbt. Die Entnahme und Präparation der Uteri erfolgt mit Hilfe einer Standlupe. Nach dem Waschen werden die Uteri 24 Stunden bei 100°C getrocknet und das Uterustrockengewicht auf 0,1 mg genau bestimmt. Wirkungsparameter ist der Quotient:

$$\frac{\text{Uterustrockengewicht (mg)}}{\text{Körpergewicht (g)}} \times 100$$

Als Standardöstrogene dienen je nach Fragestellung Östron, Östriol, meso-Hexöstrol und Diäthylstilböstrol. Alle getesteten Lösungen werden kurz vor Versuchsbeginn hergestellt. Das maximale Injektionsvolumen beträgt pro Tier und Tag 0,1 ml. Die Injektion erfolgt mit Nadeln der Größe 20. Die statistische Auswertung und die Wertbemessung wird nach Cavalli-Sforza⁺ (103) vorgenommen. Es werden dazu nur Dosen im linearen Bereich der log. Dosis-Wirkungskurve verwendet. Die relativen uterotropen Aktivitäten können nur bei Substanzen mit parallelem Dosis-Wirkungskurvenverlauf von Standard- und Testsubstanz angegeben werden. Die maximale Wirkung von Test- und Standardsubstanz wird mit dem F- und T-Test (109) verglichen.

⁺) bzw. nach Borth und Mitarb. (104)

3.3. Antiuterotroper Test (105)

Im antiuterotropen Test wird die Fähigkeit von Substanzen geprüft, das durch ein Östrogen (z.B. Östron) stimulierte Uteruswachstum juveniler Tiere zu hemmen.

Da sich der uterotrope und der antiuterotrope Test bezüglich Tiermaterial, zeitlichem Ablauf des Versuchs und der Aufarbeitung der entnommenen Uteri gleichen, wird auf eine nochmalige Beschreibung verzichtet.

Die nach dem Randomisieren erhaltenen Tiergruppen werden wie folgt behandelt:

Der ersten Gruppe wird Lösungsmittel ohne Testsubstanz subcutan gespritzt (0-Wert). Die zweite Gruppe erhält 0,32 µg Östron pro Tier und Versuch (Standard). Den weiteren Gruppen wird gleichzeitig mit der entsprechenden Menge Testsubstanz der Östron-Standard (sc.) jeweils verabreicht. Die Hemmung des Östron-stimulierten Uteruswachstums wird nach folgender Formel berechnet:

$$\% \text{ Hemmung} = 100 - \frac{(W_{S,T} - W_o)}{W_S - W_o} \times 100$$

W: Wirkung = $\frac{\text{Uterustrockengewicht (mg)}}{\text{Körpergewicht (g)}} \times 100$

W_S : Wirkung Standard

$W_{S,T}$: Wirkung des Standards bei gleichzeitiger Gabe der Testsubstanz

W_o : Wirkung des Lösungsmittels, 0-Wert

Die Prüfung auf Signifikanz der beschriebenen Hemmeffekte erfolgt mit dem F- und T-Test (109).

3.4. Kolpotroper Test (Allen-Doisy-Verfahren) (114)

Weibliche, ca. 15 g schwere NMRI-Mäuse (Fa. Wiga, Sulzfeld) werden unter Aethernarkose ovariectomiert. Die Vollständigkeit der Kastration wird durch Entnahme von Scheidenabstrichen 10 Tage nach der Ovariectomie überprüft. Am 11. Tag erhalten die Tiere subcutan eine einmalige 'Priming'-Dosis von 0,2 µg Östradiol-3-benzoat. Nur Tiere, die mit einem vollen Östrus (verhornte, kernlose Epithelzellen) reagieren, werden für die Testung verwendet. 10 Tage nach der 'Priming'-Dosis erhalten pro Dosis 3 Tiere an 3 aufeinanderfolgenden Tagen um 9 Uhr die Testsubstanzen subcutan verabreicht. Die Scheidenabstriche werden am 3. Versuchstag nachmittags um 15 Uhr, am 4. und 5. Tag um 9 und 15 Uhr, entnommen. Am 5. Versuchstag werden die Tiere nach Entnahme des letzten Abstrichs wieder mit Östradiol-3-benzoat gespritzt. 10 Tage später werden die Tiere erneut für Testungen verwendet. Die ovariectomierten Tiere werden für die Dauer von 5 Monaten zu Versuchen hergenommen. Die Abstriche werden durch Scheidenspülungen erhalten. Dazu wird mit einer 10 µl Eppendorfpipette physiologische Kochsalzlösung in die Scheide gespritzt und die sofort wieder aufgesaugte Flüssigkeit auf einen Objektträger gebracht. Die Abstriche werden an der Luft getrocknet, fixiert, mit Löfflers Methylenblaulösung (Fa. Merck, Darmstadt) 10 Minuten angefärbt, gewaschen und mikroskopiert.

Die Abstriche werden nach folgendem Schema klassifiziert:

- O: Leukozyten, Schleim, kleine polygonale kernhaltige Zellen (Diöstrus)
- x: Mischung aus Leukozyten und Epithelzellen (Übergang zwischen Di- und Proöstrus)
- y: kernhaltige bzw. kernhaltige und verhornte Zellen, keine Leukozyten (Proöstrus)
- z: kernhaltige bzw. kernhaltige und verhornte Zellen und bis zu 50 % Leukozyten (charakteristisch für Antiöstrogene wie Nafoxidin, Terenius (114))
- 1: nur verhornte, kernlose Zellen (Östrus).

3.5. In-vitro-Prüfung von Verbindungen auf Hemmung der DNA-, RNA- und Proteinsynthese sowie auf cytocide Wirkung am Walker-256-Carcinosarkom

3.5.1. Isolierung der Tumorzellen

Der Ascites wird weiblichen SD-Ratten 3 Tage nach der intraperitonealen Transplantation entnommen. Die Tumorzellen werden durch Zentrifugieren (800 Upm, 15 min) und Abgießen des Überstandes von den Erythrozyten getrennt. Der Zellniederschlag wird in Ringer-Glucose-Lösung resuspendiert und erneut bei 800 Upm (15 min) abzentrifugiert. Dieser Vorgang wird 2 x durchgeführt. Die Tumorzellen werden mit steril hergestelltem Kulturmedium nach Karzel und Schmid (106) auf 2×10^6 Zellen/ml eingestellt. Statt Pferdeserum verwenden wir 10 % Kalbsserum, das vorher bei 56°C 30 min inaktiviert wird. Statt Leucin wird bei dem Einbauversuch 0,2 mM Isoleucin dem Medium zugesetzt. Die Zellzählung erfolgt mit der Neubauer-Zählkammer. Die Zahl der vitalen Zellen wird mit der Trypanblau-Ausschlußfärbung (107) festgestellt, wobei gefärbte Zellen als tot betrachtet werden: 5 µl einer 0,2 %igen Trypanblau-Lösung werden dazu in die Inkubationsansätze gegeben und 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend werden die toten und lebenden Zellen in der Neubauer-Kammer gezählt. Die Ausbeute an lebenden Zellen beträgt beim Ascites des Walker-256-Carcinosarkoms 85 - 92 %.

3.5.2. Inkubation mit ^3H -Präkursoren

Die Inkubation mit radioaktiven Präkursoren erfolgt mit einem modifizierten Verfahren nach Weitzel et al. (108) bei 37°C. Ein Inkubationsansatz enthält: 2 ml Zellsuspension (2×10^6 Zellen/ml), 0,2 ml Hemmstofflösung, 0,2 ml ^3H -Präkursor^{+) (2 µCi).}

^{+) Als Präkursoren werden verwendet: ^3H -Thymidin (spez. Akt. 50,8 Ci/mMol), ^3H -Uridin (27,8 Ci/mMol), ^3H -Leucin (40,7 Ci/mMol).}

Bei den Einbaustudien wird die Zellsuspension 1 h mit den Hemmstoffen vorinkubiert. Anschließend wird 1 h mit den Präkursoren ^3H -Thymidin und ^3H -Uridin inkubiert. Die ^3H -Leucin-Inkubation dauert 3 h. Pro Konzentration der Hemmstofflösung (es wurden mindestens 4 Konzentrationen getestet), pro Kontrolle und Background werden 6 Versuche angesetzt. Als Kontrolle dient der Inkubationsansatz mit 0,2 ml Kulturmedium statt der Hemmstofflösung; als Background werden tote Tumorzellen verwendet, deren Zelltod durch mehrmaliges Einfrieren bis -70°C und Auftauen erreicht wird. Ein gleichmäßiger Einbau (Standardabweichung $< 10\%$) wird durch Rühren der Inkubationsansätze mit einem Magnetrührer unter Verwendung eines 1 cm langen Teflonfisches erreicht. Der Einbau wird gestoppt, indem 1 ml aus jedem Inkubationsröhrchen entnommen und in 3 ml einer eisgekühlten, unmarkierten 10^{-3} M Präkursorlösung pipettiert wird. Die Zellen werden bei 2800 Upm abzentrifugiert und 2 x mit 3 ml einer 10^{-3} M unmarkierten Präkursorlösung gewaschen. Nach dem letzten Waschvorgang wird der Zellkuchen mit 1 ml 0,1 % SDS (SDS = Natriumdodecylsulfat) 30 Minuten lysiert. Nach der Lyse wird die säureunlösliche Fraktion mit 4 ml einer 10 % TCA-Lösung gefällt. Die Niederschläge, die die eingebauten Präkursoren enthalten, werden 1 h bei 0°C stengelassen, anschließend auf Glasfaserfiltern ($\varnothing = 25$ mm) abgesaugt, 2 x mit 5 % TCA, 1 x mit Aethanol und 1 x mit einem Aethanol/Aether-Gemisch gewaschen. Die Filter werden in Polyäthylenfläschchen gebracht, 1 h bei 50°C getrocknet und anschließend mit 10 ml Toluol-Szintillator (42 ml Liquifluor^(R) ad 1 Liter Toluol) versetzt. Nach 2stündigem Stehenlassen werden in einem Beckman LS 133 die Zahl der Zerfälle der eingebauten ^3H -Präkursoren gezählt. Zählausbeute für Tritium 36,6 %.

Die Hemmeffekte der einzelnen Dosen, ausgedrückt in % zur Kontrolle, werden in Probits transformiert. Die Berechnung der ED_{50} und der Standardabweichung erfolgte mit Hilfe der Probitanalyse (109).

3.6. Testung tumorhemmender Verbindungen am DMBA-induzierten hormonabhängigen Mammacarcinom der SD-Ratte

3.6.1. Tumorinduktion

Weiblichen Sprague-Dawley-Ratten aus eigener Zucht werden am 50., 53. und 56. Lebenstag je 2 mg Dimethylbenz(-a-)anthrazen (DMBA), gelöst in 0,05 ml Dimethylsulfoxyd (DMSO), intravenös in die Schwanzvene verabreicht (110). Die Ausbeute an mammatumortragenden Tieren beträgt mit diesem Induktionsschema ca. 50 %.

3.6.2. Therapieschema und Datenerfassung

Ab dem 40. Tag nach der Tumorinduktion werden die Tiere einmal wöchentlich auf neu auftretende Tumoren percutan abgetastet. Die zwischen dem 50. und 120. Tag (111) nach der Induktion erscheinenden Tumoren werden für die Therapie verwendet, sobald sie eine angenäherte Mindestfläche von ca. 140 mm² pro Tier erreicht haben. Die Tumorfläche wird nach Mückter und Moré (112) ermittelt und ergibt sich als Produkt aus dem mit einer modifizierten Schublehre gemessenen größten und kleinsten Durchmesser eines percutan tastbaren Tumors. Die behandlungsfähigen Tiere werden in Gruppen zu 8 - 12 Tieren mit einer Gesamttumorfläche von 1900 - 2400 mm² zusammengefaßt. Die Tiere erhalten Altromin^(R) als Futter und Trinkwasser ad libitum. Den Kontrolltieren wird das Lösungsmittel der Testsubstanz, den Therapietieren die Testsubstanz Montag, Mittwoch und Freitag während der 3 - 4wöchigen Behandlungsdauer appliziert. Die Messung der Tumorflächen und der Tiergewichte erfolgt ebenfalls an o.g. Wochentagen.

3.6.3. Auswertung der Versuche am DMBA-induzierten Mammacarcinom

Die Tumorflächen werden in den Quotienten

$$\left(\frac{\text{gemessene Fläche}}{\text{Anfangsfläche}} - 1 \right) \times 100$$

transformiert. Ebenso wird mit den gemessenen Tiergewichten verfahren. Mit diesem Quotienten wird die Abhängigkeit der Daten von unterschiedlichen Tumorflächen zu Versuchsbeginn umgangen. Neben den Angaben über die Tierzahl, die Anzahl der Tumoren und die Therapiedauer enthalten die Tabellen die prozentuale Tiergewichtsänderung in der ersten Versuchswoche, die die Ursache von Tumورهemmung sein kann (6). Zur Beurteilung der Tumورهemmung werden folgende Kriterien gewählt:

1. Das Wachstumsverhalten der Tumoren von Behandlungs- und Kontrollgruppe
 - a) Tumoren, die sich während der Behandlung völlig zurückbilden (VH = völlige Hemmung)
 - b) Tumoren, deren Fläche während des Versuches kleiner wurde oder keine Veränderung zeigte (TH = teilweise Hemmung)
 - c) Tumoren ohne offensichtliche Wachstumshemmung (KH = keine Hemmung)
 - d) Tumoren, die während des Versuches neu auftreten; diese Tumoren werden ebenfalls in die Klassen a - c eingeteilt (NT = neue Tumoren)
2. Der Quotient aus Gesamttumorfläche der Behandlungsgruppe und der entsprechenden Kontrollgruppe am letzten Versuchstag (T/C).
3. Die Mittelwerte der prozentualen Tumorflächenänderung aller Tiere einer Versuchsgruppe am Versuchsende gegenüber der Tumorfläche zu Therapiebeginn.

Die statistische Auswertung der Versuche am DMBA-induzierten Mammatumor der SD-Ratte erfolgt mit dem U-Test von Wilcoxon, Mann und Whitney (113). Dieses nicht parametrische Prüfverfahren vergleicht zwei unabhängige Stichproben aufgrund ihrer Rangsummen. Die Stichproben bestehen aus der Therapie- und Kontrollgruppe, wobei als Variable die prozentuale Tumorflächenänderung der einzelnen Tiere jeder Behandlungsgruppe am Versuchsende miteinander verglichen werden.

3.7. Analytische Methoden

Zur Überprüfung der Identität und Reinheit der getesteten Substanzen wurden folgende Verfahren herangezogen:

3.7.1. Dünnschichtchromatographie

3.7.1.1.

Trägermaterial: Kieselgelfertigplatten F₂₅₄ (Fa. Merck).

3.7.1.2.

Fließmittel der nicht substituierten bzw. substituierten Stilb-Östrole und Hexöstrole (Verb.Nr. 1 - 20):

- | | |
|--|-------------|
| a) Chloroform/Cyclohexan/MeOH/NH ₃ -gesätt. CHCl ₃ | 50:40:10:10 |
| b) Chloroform/Cyclohexan/MeOH | 60:30:10 |

3.7.1.3.

Fließmittel der 1,2-Diphenyl-bzw. 1,2-Diaryl-äthylendiamine (Verb.Nr. 21 - 69)

- | | |
|------------------------------|----------|
| a) Benzol/Methanol | 90:10 |
| b) n-Butanol/Wasser/Eisessig | 90: 9: 1 |
| c) Benzol/Dioxan/Eisessig | 90: 5: 5 |

3.7.1.4.

Fließmittel der Imidazole (Verb.Nr. 70 - 73)

- | | |
|-----------------------------------|----------|
| a) Butanol/Eisessig/Wasser | 66:17:17 |
| b) Chloroform/Cyclohexan/Methanol | 60:30:10 |

3.7.1.5.

Detektionsmittel

- a) UV₂₅₄
- b) Jod-Jodkali-Lösung

3.7.2. Schmelzpunkte

wurden mit der Apparatur nach Dr. Tottoli der Fa. Büchi bestimmt.

3.7.3. ¹HNMR-Spektren

wurden in 10 %igen Lösungen mit einem Varian T-60 Spektrometer aufgenommen.

3.7.4. Elementaranalysen

wurden mit dem CHN Analyser Modell 185 der Fa. Hewlett-Packard durchgeführt.

3.7.5. Präparative Dünnschichtchromatographie

Eine Östrogenrezeptoraffinität des Diäthylstilböstrols und des Hexöstrols ist noch im Picogramm-Bereich meßbar. Da die Nachweisgrenze der Gaschromatographie für Diäthylstilböstrol im Nanogramm-Bereich liegt und die ermittelte Nachweisgrenze der Dünnschichtchromatographie im Mikrogrammbereich liegt, ist eine Reinheitskontrolle mit diesen Methoden nicht möglich.

Um falsche positive Ergebnisse auszuschließen, wurde mit Hilfe der präparativen Dünnschichtchromatographie eine Reinigung der Versuchssubstanzen vorgenommen, die aus Diäthylstilböstrol bzw. Hexöstrol (Verb.Nr. 4 - 7, 11 - 13, 18, 19) hergestellt wurden.

Die Fließmittel werden so gewählt, daß sich die Rf-Werte der synthetisierten Substanzen von denen der Ausgangssubstanzen deutlich unterscheiden.

Die Verbindungen werden vor und nach der präparativen DC auf Affinität zum Östrogenrezeptor getestet. Unterscheiden sich die gemessenen Hemmeffekte (^3H -Östradiolverdünnung: 10^{-9} M; Hemmstoffkonzentration: 10^{-4} M) nicht, so werden die Substanzen zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten K_i , der Reversibilität und für die Tierversuche weiterverwendet; im anderen Fall werden sie einer erneuten Reinigung unterzogen.

3.7.5.1. Trägermaterial

PSC Kieselgelfertigplatten F₂₅₄ (Fa. Merck).

3.7.5.2. Fließmittel

- | | |
|--|-------------|
| a) Chloroform/Cyclohexan/MeOH (Verb.Nr. 18, 19) | 60:30:10 |
| b) Butanol/Eisessig/Wasser (Verb.Nr. 11 - 13) | 66:17:17 |
| c) Chloroform/Cyclohexan/MeOH/NH ₃ -gesätt. Chloroform (Verb.Nr. 4 - 7) | 50:40:10:10 |

Die Substanzen werden von der DC-Platte in eine Reibschale gebracht, fein gepulvert und mit Chloroform extrahiert. Letzteres wird am Rotavapor abgezogen. Die Substanzen werden sodann aus heißem Äther kristallisiert.

3.7.6. Messung der Radioaktivität*

3.7.6.1.

Meßgerät: Liquid Scintillationssystem LS 133 (Fa. Beckman)

3.7.6.2.

Meßdaten:

Kanal 1:	totale Radioaktivität
Kanal 2:	50 % der totalen Radioaktivität (ohne Quench)
Preset Error:	0,2 %
Preset Min.:	10 Minuten pro Kanal
Zählausbeute:	36,6 % für Tritium

3.7.6.3. Szintillatoren**

- a) Toluol-Triton X-100: PPO 5,0 g, DimethylPOPOP 0,3 g, Triton X-100 400 ml, Toluol für Szintillationsmessung (Fa. Merck) 600 ml.
- b) Toluol-Liquifluor^R: 42 ml Liquifluor werden in 1 l Toluol gelöst.

3.7.6.4. ³H markierte Substanzen

- a) Östradiol 6,7 - ³H (N); spezifische Aktivität 49,3 Ci/mmol. Das Lösungsmittel des Handelspräparats ³H-Östradiol (Benzol/Äthanol 9:1) wird mit N₂ abgedampft und der Rückstand in absolutem Äthanol zu 10⁻⁶ M gelöst. Aus dieser Stammlösung werden mit Trispuffer die Gebrauchslösungen hergestellt. Die Stammlösung wird bei -15°C aufbewahrt.

* Alle für die Radioaktivitätsmessung verwendeten Substanzen wurden, falls nichts anderes angegeben, von der Fa. New England Nuclear, Dreieichenhain/Frankfurt, bezogen.

** PPO = 2,5-Diphenyloxazol; DimethylPOPOP = p-Bis-2-(4-methyl-5-phenyloxazolyl)benzol; Triton X-100 = Isooctyl-phenyloxy-polyäthoxy-äthanol.

- b) Leucin 4,5-³H (N) : 40,7 Ci/mmol
- c) Thymidin methyl-³H : 50,8 Ci/mmol
- d) Uridin 5-³H : 27,8 Ci/mmol

Die markierten Verbindungen b) - d) werden mit physiologischer Kochsalzlösung auf die Endkonzentrationen verdünnt.

3.8. Bereitung der Substanzen für die Tierversuche

3.8.1.

Östriol, Östron, Hexöstrol, Diäthylstilböstrol, die isomeren Hexöstrole und Diäthylstilböstrole werden in Livio^R gelöst und subcutan verabreicht.

3.8.2.

Nafoxidin wird in einer 40 % Propandiol enthaltenden, physiologischen NaCl-Lösung gelöst und subcutan verabreicht.

3.8.3.

Die Salze der substituierten Diäthylstilböstrole und Hexöstrole, der 1,2-Diphenyl- bzw. 1,2-Diaryl-äthylendiamine und der Imidazole werden in einem Porzellanmörser fein zerrieben und in Anteilen unter Rühren mit einer isotonischen 5 %igen Mowiol-Lösung (N 50-88 Hoechst) versetzt. Anschließend wird diese Suspension 3 Minuten mit Ultraschall behandelt. Die so hergestellten Suspensionen werden, falls nichts anderes angegeben, intraperitoneal verabreicht.

4. Zusammenfassung

Seit einigen Jahren werden potentielle Antiöstrogene (Wirktyp A) und Östrogenrezeptor-affine Cytostatica (Wirktyp B) am disseminierten hormonabhängigen Mammacarcinom therapeutisch erprobt. Antiöstrogene hemmen das Tumorstadium wahrscheinlich durch eine Blockade der wachstumsstimulierenden Effekte endogener Östrogene; Östrogenrezeptor-affine Cytostatica sollen sich in der Tumorzelle anreichern und so selektive Antitumoreffekte entfalten.

Ausgehend von den synthetischen Östrogenen Diäthylstilböstrol und Hexöstrol wurden folgenden Verbindungsklassen der Wirktypen A und B im Arbeitskreis entwickelt:

- A. I. 3,4-Di-(2'-, 3'- und 4'-hydroxyphenyl)-hexane
- II. 2,2'-, 3,3'- und 4,4'-Dihydroxy- α , β -diäthylstilbene
- III. racem- und meso-N,N'-Dialkyl-1,2-diaryl-äthylendiamine
- IV. 4,5-Di-(4'-hydroxyphenyl)-imidazole
- B. I. 3,4-Di-(3'-aminomethyl-4'-hydroxyphenyl)-hexane
- II. 3,3'-Di-(aminomethyl)-4,4'-dihydroxy- α , β -diäthylstilbene

In der vorliegenden Arbeit wurde die Prüfung der vorstehenden Verbindungsklassen durchgeführt und Vorstellungen zum Wirkungsmechanismus entwickelt.

Die biologische Bewertung der Substanzen erfolgte an folgenden 8 Testverfahren:

1. Hemmung der Östradiol-Rezeptor-Wechselbeziehung in vitro
2. Prüfung auf kolpotrope und uterotrope Wirkung
3. Prüfung auf antiuterotrope Wirkung
4. Bestimmung der Reversibilität der Inhibitor-Rezeptor-Bindung in vitro
5. Prüfung am DMBA-induzierten hormonabhängigen Mammatumors der SD-Ratte
6. Bestimmung der cytociden Wirkung am Walker-256-Carcinosarkom in vitro

7. Hemmung der DNA-, RNA- und Proteinsynthese am Walker-256-Carcinosarkom in vitro
8. Prüfung der Substanzen an hormonunabhängigen Tumoren in vivo

Die entsprechend obigem Testsystem durchgeführten Versuche ergeben folgende Ergebnisse:

3,3'-HES (Verb.Nr. 2) und 3,3'-DES (Verb.Nr. 9), Substanzen des Wirktyps AI und AII, hemmen die Östradiol-Rezeptor-Wechselbeziehung kompetitiv; sie sind trotz hoher Affinität zum Rezeptorprotein schwache Östrogene (Wirktyp: "impeded"- bzw. "partielle"-Östrogene). Ihre antiöstrogene Wirkung ist mit der von Nafoxidin vergleichbar. Die Reversibilität der 3,3'-HES- bzw. 3,3'-DES-Rezeptor-Bindung ist gegenüber der von Nafoxidin stark verringert. Die Verbindungen sind am hormonabhängigen DMBA-induzierten Mammatumor der SD-Ratte dem Nafoxidin überlegen. Sie hemmen in vitro die Nukleinsäuresynthese und zeigen cytocide Eigenschaften, sind aber an hormonunabhängigen Tumoren in vivo unwirksam.

2,2'-HES und 2,2'-DES (Verb.Nr. 1 und 8) verursachen eine kompetitive Hemmung der Östradiol-Rezeptor-Bindung, wirken östrogen (Wirktyp: echtes Östrogen), aber nicht antiöstrogen.

Durch Verlagerung der OH-Gruppen von 4,4'-Dihydroxy- α , β -diäthylstilben und 3,4-Di-(4'-hydroxyphenyl)-hexan in die benachbarten Positionen gelang die Umwandlung hochaktiver Östrogene in Verbindungen mit ausgeprägten antiöstrogenen Eigenschaften. Ihre mammatumورهemmende Wirkung entspricht dem therapeutischen Effekt der Ovariectomie.

Unter den Verbindungen des Wirktyps AIII hemmen lediglich die racem- und meso-N,N'-Dialkyl-1,2-di-(2',6'-dichlorphenyl)-äthylen-diamine (Verb.Nr. 62 - 64) die Östradiol-Rezeptor-Wechselbeziehung kompetitiv. Sie zeigen trotz dieses Befundes weder östrogene noch antiöstrogene Eigenschaften. Die Inhibitor-Rezeptor-Bindung ist teilweise (Verb.Nr. 64b) oder voll (Verb.Nr. 64a) reversibel. Die Prüfung der rezeptor-affinsten Verbindung meso-N,N'-Dipropyl-1,2-di-(2',6'-dichlorphenyl)-äthylen-diamin (Verb.Nr. 64b) am DMBA-induzierten hormonabhängigen Mammatumor der SD-Ratte ergab

keine signifikante Wirkung. Verbindungen des Wirktyps AIII zeigen in den Versuchen 6 und 7 keine cytostatische Wirkung.

Der Mechanismus der mammatumورهemmenden Wirkung der N,N'-Dialkyl-1,2-diaryl-äthylendiamine ist nicht mit östrogenantagonistischen Effekten allein erklärbar. Zu seiner Klärung sind weitere Untersuchungen erforderlich.

4,5-Di-(4'-hydroxyphenyl)-imidazole (Verb.Nr. 71 - 73), Verbindungen des Wirktyps A IV, hemmen in vitro kompetitiv die Östradiol-Rezeptor-Wechselbeziehung, während sie in vivo weder östrogene noch antiöstrogene Wirkungsqualitäten zeigen. Ihre Inhibitor-Rezeptor-Bindung ist stark reversibel. Die beobachtete Wirkung von 2-Phenyl-4,5-di-(4'-hydroxyphenyl)-imidazol (Verb.Nr. 71) am Mammatumor der Ratte war nicht signifikant. Verbindungen des Wirktyps AIV zeigen in den Versuchsanordnungen 6 und 7 eine deutliche cytostatische Wirkung. Sie führen in vivo zu einer Lebensverlängerung von Versuchstieren mit hormonunabhängigen Tumoren.

3,4-Di-(3'-aminomethyl-4'-hydroxyphenyl)-hexane (Verb.Nr. 4 und 5), potentielle Cytostatica vom Wirktyp BI, hemmen kompetitiv die Östradiol-Rezeptor-Wechselbeziehung. Es handelt sich bei dieser Verbindungsklasse um echte Östrogene. Die Prüfung auf cytocide Wirkung und Hemmung der Nukleinsäure- und Proteinbiosynthese ergab gegenüber der Syntheseausgangsverbindung Hexöstrol keine verbesserten Effekte.

3,3'-Di-(aminomethyl)-4,4'-dihydroxy- α,β -diäthylstilbene (Verb. Nr. 13 - 17), potentielle Cytostatica vom Wirktyp BII, zeigen keine Affinität zum Östrogenrezeptor. Sie sind weder östrogen noch antiöstrogen. Ihre cytostatische Wirkung liegt ebenfalls unter der der Syntheseausgangsverbindung Diäthylstilböstrol.

3,4-Di-(3'-aminomethyl-4'-hydroxyphenyl)-hexane und 3,3'-Di-(aminomethyl)-4,4'-dihydroxy- α,β -diäthylstilbene sind aufgrund der vorliegenden Versuchsergebnisse nicht, wie ursprünglich angenommen, als östrogenrezeptor-affine Cytostatica anzusehen.

5. Literaturverzeichnis

1. Wall M.E. et al. J.Med.Chem. 12, 810 (1969)
2. Schmitt-Wallenborn H. Dissertation Universität München,
in Vorbereitung
3. Schmidt F. Dissertation Universität München
(1970)
4. Adam D. Dissertation Universität München
(1967)
5. Mautz J. unveröffentlicht
6. Hoffmann E. Dissertation Universität München
(1975)
7. Taneja A.K. Dissertation Universität München
(1976)
8. Bernhauer H. Dissertation Universität München
(1965)
9. Beatson G.T. Lancet 2: 162 (1896)
10. Jensen E.V./Jakobsen H.I. Rec.Progr.Horm.Res. 18, 387 (1962)
11. Noteboom W.D./Gorski J. Arch.Biochem.Biophys. 11, 559 (1965)
12. Toft D./Gorski J. J.Cell.Biol. 27, 107 A (1965)
13. Toft D./Gorski J. Proc.Nat.Acad.Sci. 55, 1574 (1966)
14. Toft D/Shyamala G./
Gorski J. Proc.Nat.Acad.Sci. 57, 1740 (1967)
15. Pfaff D.W. Endocrinology 82, 1149 (1968)
16. Sander S. Acta Endocrinol. 58, 49 (1968)
17. Deshpande N. et al. Steroids 10, 219 (1967)
18. Jensen E.V. Proc.Can.Cancer Res.Conf. 6, 143
(1965)
19. Maas H./Engel B./Trams G.J. Steroid Biochem. 6, 743 (1975)
et al.

20. Mercier-Bodard C./Alfsen A. Sex steroid binding plasma protein; in E. Diczfalusy (Ed.); Karolinska Symposia on Research Methods in Reproductive Endocrinology, Geneva 1970, S 204 (Stockholm 1970)
21. Raynaud J.P./Mercier-Bodard C. et al.
Steroids 18, 767 (1971)
22. Milgrom E./Atger M. et al.
Biochim.Biophys. Acta 320, 267 (1973)
23. Robertson D.M./Mester J. et al.
Acta Endocrinol. 68, 534 (1971)
24. Bresciani F./Puca G.A. et al.
Cold Spring Harbor Conf. Cell Proliferation 1, 67 (1974)
25. DeSombre E.R./Chabaud J.P. et al.
J. Steroid Biochem. 2, 95 (1971)
26. Puca G.A./Bresciani F. Nature 225, 1251 (1970)
27. Notides A./Hamilton D.E. et al.
Endocrinology 93, 210 (1973)
28. DeSombre E.R./Mohla S. et al.
Biochem.Biophys.Res.Comm. 48, 1601 (1972)
29. Glasser S.R./Chytil F.et al.
Biochem.J. 130, 947 (1972)
30. Barnea A./Gorski J. Biochemistry 9, 1899 (1970)
31. DeSombre E.R./Mohla S. et al.
J.Steroid Biochem. 6, 469 (1975)
32. Schulster D./Burstein S. et al.
Molecular Endocrinology of the Steroid Hormones, Wiley and Sons (London-New York-Sydney-Toronto) 1976, S. 245

33. Hähnel R./Twaddle E. et al.
J.Steroid Biochem. 4, 687 (1973)
34. Korenman S.G./Dukes B.A. J.clin.Endocrinol. 30, 639 (1970)
35. Lippman M.E./Bolan G. Nature 256, 592 (1975)
36. Terenius L. Acta Endocrinol. 64, 47 (1970)
37. Terenius L. Acta Endocrinol. 66, 431 (1971)
38. Jensen E.V./Jacobson H.I. et al.
Estrogen receptors in target tissues;
in Nakao, Pincus and Tait (Eds.):
Steroids dynamics, Academic Press,
(New York) 1966, S. 133
39. Rochefort H./Capon F. FEBS Lett. 20, 11 (1972)
40. Clark J.H./Anderson J.N. et al.
Steroids 22 (5), 707 (1973)
41. Heuson I.C. et al. Gynec.Invest. 2, 130 (1972)
42. Katzenellenbogen B./Katzenellenbogen J.A.
Biochem.Biophys.Res.Comm. 50 (4),
1152 (1973)
43. Jordan V.C./Koerner S. J.Endocrinol. 64 (1), 193 (1975)
44. Lippman M./Bolan G. et al.
Cancer Res. 36, 4595 (1976)
45. Nicholson R.I./Golder M.P.
Eur.J.Cancer 11, 571 (1975)
46. Huggins C.H. J.exp.Med. 102, 335 (1955)
47. Leung B.S./Sasaki G.H. et al.
Cancer Res. 35, 621 (1975)
48. Griswold D.P./Skipper H.E. et al.
Cancer Res. 26, 2169 (1966)
49. Simpson-Herren/Griswold D.P.
Cancer Res. 30, 813 (1970)
50. Baserga R. The Cell Cycle and Cancer, Marcel
Dekker Inc., New York 1971

51. Jensen E.V./DeSombre E.R. *Ann. Rev. Biochem.* 41, 203 (1972)
52. Andrisano R. et al. *J. Chem. Soc. C* 1970, 1866
53. Powell-Jones W./Jenner D. et al.
Biochem. J. 150, 71 (1975)
54. Shepherd R.E./Huff K. et al.
J. nat. Cancer Inst. 53, 895 (1974)
55. Geynet C./Millet C. et al.
Gynec. Invest. 3, 2 (1972)
56. Terenius L. *Eur. J. Cancer* 7, 57 (1971)
57. Schueler F.W. *Science* 103, 221 (1946)
58. Breuer H. *Vitamins and Hormones* 20, 285 (1962)
59. Metzler M. *J. Toxicol. Envir. Health Suppl.* 1, 21 (1976)
60. Anderson J.N./Peck E.J. et al.
Endocrinology 96, 160 (1975)
61. Gallez Gh./Heuson J.C. et al.
Eur. J. Cancer 9, 699 (1973)
62. Rochefort H./Lignon F. et al.
Gynec. Invest. 3, 43 (1972)
63. Hospital M./Busetta B. et al.
J. of Steroid Chemistry 6, 221 (1975)
64. Hospital M./Busetta B. et al.
Mol. Pharmacol. 8, 438 (1972)
65. Cooper A./Norton D.A. et al.
Acta Cryst. B 25, 814 (1969)
66. Watson J.D. *Molecular Biology of the Gene*, Benjamin (New York) 1969

67. Gill E.W. Drug Receptor Interactions; in Ellis and West (Eds.): Progress in medicinal Chemistry 4; Butterworths (London), 1965, S. 51
68. Dietrich L.J. Cancer Res. 21, 502 (1961)
69. Gorski J./Williams D. et al. The Continuing Evolution of an Estrogen-Rezeptor Model; in O'Malley and Means (Eds.): Receptors for Reproductive Hormones, Plenum Press (New York-London) 1973
70. Martz G. Die hormonale Therapie maligner Tumoren, Springer Verlag, Berlin, 1968, S. 29
71. Schönenberger H./Bernhauer H. Arch.Pharm. 303, 804 (1970)
72. Egginger G. Dissertation Universität München, in Vorbereitung
73. Schönenberger R./Sunkel C. et al. Arzneim.-Forsch. 22, 1952 (1972)
74. Jensen E.V./Brecher P.J. et al. Estrogen Interaction with Target Tissues; in O'Malley and Hardman (Eds.): Methods in Enzymology Vol. 36 A, Academic Press (New York-San Francisco-London), 1975, S. 267
75. Scholtan W. Arzneim.-Forsch. 18, 505 (1968)
76. Schönenberger H./Krötsch U. et al. Dtsch.Apoth.-Ztg. 115, 1244 (1975)
77. Hellmann H./Opitz G. α -Aminoalkylierung, Verlag Chemie, Weinheim 1960, S. 284
78. Hellmann H./Opitz G. α -Aminoalkylierung, Verlag Chemie, Weinheim 1960, S. 253

79. Hüttenrauch R. Pharmazie 28, 84 (1973)
80. Ponsold K./Schlegel J. et al.
Pharmazie 30, 32 (1975)
81. Ponsold K./Hübner M. et al.
Arzneim.-Forsch. 24, 896 (1974)
82. Schmährl D. Arzneim.-Forsch. 7, 211 (1957)
83. Schönenberger H./Kranzfelder G. et al.
Pharmazie 31, 590 (1976)
84. Zimel H./Milcu S. D.A.S. 22 31 486 (1973)
85. Schönenberger H./Griebel G. et al.
Arzneim.-Forsch. 21, 2104 (1971)
86. Lombardino J.G./Wiseman E.H.
J.Med.Chem. 17, 1182 (1974)
87. Wiseman E.H./McIlhenny H.M. et al.
J.Pharm.Sci. 64, 1469 (1975)
88. Powles T.J./Clark S.A. et al.
Brit.J. Cancer 28, 316 (1973)
89. Klein D.C./Raisz L.G. Endocrinology 86, 1436 (1970)
90. Schmährl D. Maligne Tumoren, Editio Cantor
(Aulendorf) 1970, S. 358
91. Lowry O.H./Rosebrough N.J. et al.
J.biol.Chem. 193, 265 (1951)
92. Puca G.A./Nola E. et al. Purification of Estrogen Receptors;
in O'Malley and Hardman (Eds.):
Methods in Enzymology Vol. 36 A,
Academic Press (New York-San
Francisco-London) 1975, S. 331
93. Korenman S.G. J.Clin.Endocrinol.Metab. 28, 127
(1968)
94. EORTC Breast Cancer Cooperativ Group
Eur.J.Cancer 9, 379 (1973)

109. Cavalli-Sforza L. Biometrie, G. Fischer Verlag Stuttgart (1972), S. 69, 153
110. Somogyi A./Kovacs K. Cancer Res. 30, 1958 (1970)
111. Teller M.N. et al. Cancer Res. 26, 245 (1966)
112. Mückter H./Moré E. Arzneim.-Forsch. 16, 129 (1966)
113. Sachs L. Statistische Auswertungsmethoden, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1. Auflage (1968)
114. Terenius L. Steroids 17, 653 (1971)
115. Volm M./Kaufmann M. et al. Arzneim.-Forsch. 25, 1042 (1975)
116. Arzneimittelkommission d. Dtsch. Ärzteschaft
Dtsch. Ärzteblatt 3, 131 (1977)
117. Herbst A.L./Poskanzer D.C. et al. N.Engl.J.Med. 292, 335 (1975)

LEBENS LAUF

Gerhard Kranzfelder

geboren am 19.9.1946 in Augsburg als Sohn des Apothekers Jakob Kranzfelder und seiner Ehefrau Liselotte, geb. Wismer.

Seit 1972 verheiratet mit Ursula Kranzfelder, geb. Karmann.

Schulbildung

1952 - 1956 Volksschule Welden

1956 - 1966 Realgymnasium Augsburg

Reifeprüfung

Juli 1966 in Augsburg

Berufsausbildung

Praktikantenzeit

1966 - 1968 Elisabeth-Apotheke in Augsburg

Pharmazeutisches

Vorexamen

September 1968 in Augsburg

Studium der Pharmazie

WS 1968/69 - SS 1971 Universität Würzburg

Staatsexamen

Oktober 1971 in Würzburg

Wehrdienst

November 1972 - Januar 1974 am Institut für Wehrpharmazie und Lebensmittelchemie in München

wissenschaftliche Arbeit

Januar 1972 - September 1976 unter Anleitung von Herrn Professor Dr. H. Schönenberger, Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität München

berufliche Tätigkeit

Mai 1972 - Oktober 1972 wiss. Mitarbeiter der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung, mbH, 8042 Neuherberg bei München

ab Februar 1974 Verwalter einer wissenschaftlichen Assistentenstelle

